

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P DE MEDICINA VETERINARIA

**Efecto de la refrigeración y la aplicación de ácido láctico
sobre la presencia de *Listeria monocytogenes*
en canales bovinas en un centro de beneficio de
Lima - Perú.**

TESIS

Para optar Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Daicy Carla Domínguez Miguel

Lima – Perú

2014

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mi amada familia: A mis padres Alejandro y Liliana y a mis hermanos Lizet y Herbert por su amor, apoyo, paciencia, confianza y ánimo constante en todo momento y también a mis pequeños, a los que están conmigo y a los que se fueron, por su compañía y amor incondicional

Agradecimiento

A Dios por permitirme existir y por su bendición en cada etapa de mi vida.

A mis padres, gracias por sus consejos y guía, por todo el trabajo y sacrificio constante que han hecho durante todos estos años y por sembrar en mí el deseo de superación y las ganas de ser Sanmarquina.

A mi asesora, la Dra. Daphne Ramos, por la orientación, apoyo y tiempo brindado no solo a mí sino a cada uno de sus tesis.

Al Dr. Néstor Falcón por su disposición y apoyo en la culminación de mi investigación.

Al Dr. Juan Lucas por la confianza depositada.

A mis amigas y amigos por el apoyo y consejos brindados durante la elaboración del proyecto, desarrollo y sustentación de mi tesis.

A mi alma mater, la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por la formación necesaria para alcanzar un lugar en el mundo profesional; fue un reto y orgullo formar parte de sus aulas.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE GRÁFICOS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
LISTA DE ANEXOS	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. CARNE BOVINA	4
2.1.1. Estructura y composición de la carne	4
2.1.2. Obtención de la carne	7
2.1.3. Cambios post mortem en la carne	8
2.1.3.1. Rigidez cadavérica	8
2.1.3.2. Cambios en el pH	9
2.1.3.3. Maduración de la carne	11
2.2. CONTAMINACIÓN Y DETERIORO DE LA CARNE	11
2.2.1. Origen de la contaminación	11
2.2.2. Microbiología de la carne	12
2.2.3. Condiciones para la proliferación microbiana	12
2.2.3.1. Actividad de agua (Aw)	13
2.2.3.2. El pH	14
2.2.3.3. El Potencial de óxido-reducción (Eh)	15
2.2.3.4. Necesidades nutritivas	15
2.2.3.5. Temperatura	15
2.2.4. Deterioro de la carne	16
2.3. LA CARNE COMO FUENTE DE ETA	16

2.4. ETA PRODUCIDA POR LISTERIA	18
2.4.1. Clasificación del género <i>Listeria</i>	18
2.4.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	19
2.4.2.1 Serotipos	19
2.4.2.2 Distribución.....	20
2.4.2.3 Morfología	21
2.4.2.4 Movimiento.....	21
2.4.3. Factores que favorecen la proliferación de <i>L. monocytogenes</i>	22
2.4.3.1. Requerimientos nutricionales.....	23
2.4.3.2. PH	23
2.4.3.3. Temperatura	23
2.4.3.4. Humedad	24
2.4.4. Listeriosis Humana.....	25
2.4.4.1. Epidemiología	26
2.4.4.2. Brotes y alimentos involucrados	27
2.4.4.3. Factores de virulencia de <i>L. monocytogenes</i>	29
2.4.4.4. Fisiopatología de la infección	31
2.4.4.5. Características clínicas de listeriosis humana	33
2.5. PROCEDIMIENTOS Y METODOS DE DESCONTAMINACION DE LA CARNE.....	37
2.5.1. Procedimientos físicos	38
2.5.1.1. Lavado o duchado con agua potable	38
2.5.1.2. Uso de agua caliente	39
2.5.1.3. Pasteurización con vapor	39
2.5.1.4. Refrigeración.....	39
2.5.1.5. Radiaciones ionizantes	40
2.5.1.6. Ultrasonido.....	41
2.5.1.7. Altas presiones	41
2.5.1.8. Iluminación instantánea de gran intensidad	41
2.5.1.9. Rayos infrarrojos.....	42
2.5.2. Procedimientos microbiológicos.....	42
2.5.2.1. Utilización de bacterias ácido lácticas	42
2.5.3. Procedimientos químicos	43

2.5.3.1. Agua clorada	44
2.5.3.2. Lactoferrina Activada (ALF)	44
2.5.3.3. Ácidos orgánicos.....	45
2.6. CONTROL DE LISTERIA MONOCYTOGENES EN CARNE	46
2.6.1. Uso de ácido láctico	47
2.6.1.1. Cambios en el pH.....	47
2.6.1.2. Acción de la forma no dissociada.....	47
2.6.2. Uso de otros perseverantes para controlar <i>L. monocytogenes</i> en carne	49
2.6.2.1. Cloruro de sodio (NaCl).....	49
2.6.2.2. El nitrito.	50
2.6.2.3. El fosfato trisódico (TSP).	50
2.6.2.4. Extractos Vegetales.....	50
2.6.2.5. Quelantes (citrato y EDTA)	50
2.6.2.6. Lisozima.....	51
2.6.2.7. Sorbato (ácido sórbico).	51
2.6.2.8. Bacteriocinas.....	51
2.6.2.9. Procesos térmicos.....	51
2.6.2.10. Radiación	52
2.6.2.11. Alta presión.....	52
2.6.2.12. Luz ultravioleta (UV).....	52
2.6.2.13. Ultrasonido.....	53
III. MATERIALES Y MÉTODOS	54
3.1. Lugar de estudio:	54
3.2. Animales de estudio	54
3.3. Materiales y equipos	54
3.3.1. Toma de muestras.....	54
3.3.2. Laboratorio	55
3.4. Tamaño de muestra	55
3.5. Metodología.....	55
3.5.1. Lugares de muestreo.....	55
3.5.2. Tratamiento de las canales	56
3.5.3. Toma de muestra y procesamiento	57

3.6. Cálculo de resultados	64
3.6.1. Análisis de la información.....	64
IV. RESULTADOS	65
V. DISCUSION	69
VI. CONCLUSIONES	77
VII. RECOMENDACIONES	78
VIII. LITERATURA CITADA	79
IX. ANEXOS	91

RESUMEN

La presencia de *L. monocytogenes* en canales bovinas la convierte en un riesgo potencial de enfermedad para los consumidores por ser causante de la Listeriosis, enfermedad a la que son más susceptibles las mujeres embarazadas y aquellas personas con un sistema inmune deprimido. Debido a ello el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del ácido láctico a una concentración del 2.5% como descontaminante de canales sobre la presencia de *L. monocytogenes* presentes en la superficie de las canales bovinas, así como evaluar el comportamiento de esta bacteria en refrigeración y bajo la acción del ácido láctico. El estudio se desarrolló en un centro de beneficio de la ciudad de Lima donde se muestrearon un total 58 canales bovinas al azar divididas en dos grupos. Las muestras tomadas fueron delimitadas por marcos estériles y correspondieron a un área total de 400 cm² por canal bovina, tomadas de 4 zonas diferentes (cadera, falda, pecho y cuello) mediante método no destructivo de hisopado. Estas muestras fueron enriquecidas en medios de cultivo específicos y sometidas a incubación para determinar finalmente la presencia de *L. monocytogenes* mediante el empleo de un Kit diagnóstico. En los resultados obtenidos se observaron canales que tuvieron cambios respecto a la presencia de la bacteria sobre la superficie de las canales antes y después de la refrigeración y de la acción del ácido láctico, sin embargo al evaluar los resultados mediante la prueba estadística de McNemar se observa que estos cambios se debieron al azar ($p > 0.05$) para el grupo 1 y para el grupo 2, el cual fue sometido a la acción del ácido láctico, se observa que hay diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) por lo que se demuestra la acción bactericida del ácido láctico al 2.5% contra de *L. monocytogenes* presentes en la superficie de las canales. Se concluye que el tratamiento con ácido láctico al 2.5% es útil como descontaminante pero su uso no reemplazaría las buenas prácticas ni a la higiene durante el proceso de beneficio o el almacenamiento en las cámaras frigoríficas debido a que el tratamiento tuvo un efecto bactericida en más del 50% pero no en la totalidad de canales bovinas evaluadas.

Palabras clave: canal, *L. monocytogenes*, listeriosis, ácido, láctico, descontaminación

ABSTRACT

The presence of *L. monocytogenes* in beef carcasses makes it a potential disease risk to consumers because it causes listeriosis, disease to which are more susceptible pregnant women and those with depressed immune systems. Because of this, the aim of this study was to evaluate the effect of lactic acid at 2.5% of concentration as decontaminating beef carcasses on the presence of *L. monocytogenes* on the surface of beef carcasses and to assess the behavior of this bacterium in cooling and under the action of lactic acid. The study was conducted in a profit center of Lima where a total 58 bovine carcasses were sampled randomly divided into two groups. The samples were enclosed by sterile frameworks and corresponded to a total area of 400 cm² per bovine carcasses, taken from 4 zones (hip, flank, brisket and neck) by non-destructive method of swabbing. These samples were enriched in specific culture media and finally subjected to incubation for the presence of *L. monocytogenes* by use of a diagnostic kit. In the results were observed carcasses who had changes for the presence of bacteria on the surface of carcasses before and after chilling and the action of lactic acid, however when evaluating the results by McNemar statistical test notes that these changes were randomized ($p > 0.05$) to group 1 and group 2, which was subjected to the action of lactic acid, it appears that no statistically significant difference ($p < 0.05$) so the bactericidal action of lactic acid 2.5% is shown against *L. monocytogenes* on the surface of carcasses. We conclude that treatment with 2.5% lactic acid is useful as a decontaminant but its use would not replace good hygiene practices or profit during storage or refrigerated chambers because the treatment had a bactericidal effect in over 50% but not all of bovine carcasses evaluated.

Keywords: carcasses, *L. monocytogenes*, listeriosis, acid, lactic, decontamination

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Consumo promedio per cápita anual de carne por ámbito geográfico, según principales tipos de carne (kg/persona).....	4
Cuadro 2.	Composición química aproximada de la carne	5
Cuadro 3.	Composición química de las carnes (según zona de la canal) y despojos comestibles, correspondientes a ganado porcino, vacuno y ovino	6
Cuadro 4.	Valores estimados del pH cárnico obtenidos en toros de la raza Holstein y Nelore durante las primeras 24 horas post mortem	10
Cuadro 5.	Clasificación de las ETA	17
Cuadro 6.	Serotipos de especies de <i>Listeria</i>	20
Cuadro 7.	Factores que impactan en el crecimiento y supervivencia de <i>L. monocytogenes</i>	22
Cuadro 8.	Síntomas clínicos asociados con la infección con <i>L. monocytogenes</i>	34
Cuadro 9.	Procedimientos de descontaminación de la carne	37
Cuadro 10.	Reducciones microbianas típicas alcanzadas por tratamientos no químicos en la descontaminación de carne	38
Cuadro 11.	Productos químicos investigados para descontaminar la carne	43
Cuadro 12.	Reducciones microbianas obtenidas por tratamientos de descontaminación química de la carne	44
Cuadro 13.	Constantes de disociación de ácidos orgánicos en soluciones acuosas.	48
Cuadro 14.	Canales positivas y negativas a la presencia de <i>L. monocytogenes</i> antes y después de la refrigeración (Grupo 1)	68
Cuadro 15.	Canales positivas y negativas a la presencia de <i>L. monocytogenes</i> antes y después de la refrigeración y el tratamiento con ácido láctico (Grupo 2)	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama de flujo del proceso de beneficio	7
Figura 2.	Aw de carne a diferentes temperaturas bajo cero	13
Figura 3.	Factores que ocasionan la presentación de ETA	17
Figura 4.	Proceso de formacion de biopelículas	21
Figura 5.	Infección por <i>L. monocytogenes</i>	30
Figura 6.	Representación esquemática de la fisiopatología de la infección por <i>L. monocytogenes</i>	32
Figura 7.	Zonas de muestreo	56
Figura 8.	Método y área total de muestreo	57
Figura 9.	Medio BLEB con 4 hisopos de cada canal evaluada	58
Figura 10.	Esquema del procedimiento empleado para detectar <i>L. monocytogenes</i>	58
Figura 11.	Incubación a 30°C de las muestras durante 24 horas en BLEB.....	59
Figura 12.	Incubación a 30oC por 24 horas en medio PALCAM	59
Figura 13.	Transferencia del sobrenadante del medio PALCAM	60
Figura 14.	Adición de la solución Pre tratamiento y lisis	60
Figura 15.	Transferencia de controles y muestras a los micropozos identificados	61
Figura 16.	Adición de solución mezcla Hibridación/sonda	61
Figura 17.	Lavado de micropozos (5 veces).....	62
Figura 18.	Coloración adquirida luego de la colocación del sustrato cromógeno.....	62
Figura 19.	Adición de la solución stop y cambios en coloración	63
Figura 20.	Lector ELISA	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Canales positivas y negativas a la presencia de <i>L. monocytogenes</i> antes y después de la de refrigeración (Grupo 1)	65
Gráfico 2.	Canales evaluadas positivas y negativas a la presencia de <i>L. monocytogenes</i> antes y después de la refrigeración y del tratamiento con ácido láctico (Grupo 2)	66
Gráfico 3.	Cambios en porcentaje de canales con respecto a la presencia de <i>L. monocytogenes</i> antes y después de la de refrigeración (Grupo 1)	67
Gráfico 4.	Cambios en porcentaje de canales con respecto a la presencia de <i>L. monocytogenes</i> antes y después de la refrigeración y del tratamiento con ácido láctico (Grupo 2)	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosin trifosfato
Aw	Actividad de agua
BAL	Bacterias ácido lácticas
BLEB	Buffered Listeria Enrichment Broth Base
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CRA	Capacidad de retención de agua
DFD	Dark, firm and dry
EFSA	European Food Safety Authority
Eh	Potencial redox
ENAPREF	Encuesta Nacional de Presupuesto Familiares
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
FSIS	Food Safety and Inspection Service
GRAS	Generally Recognized As Safe
IC	Intervalo de confianza
INEI	Instituto Nacional de Estadística e Informática
Inl A	Interleucina A
Inl B	Interleucina B
ISO	International Organization for Standardization
MPa	Megapascal
MINAG	Ministerio de Agricultura (Perú)
OMS	Organizacion Mundial de la Salud
PALCAM	Polimixina, acriflavina, litio, ceftazidime, esculina y manitol
pka	Constante de disociación
pH	Potencial de hidrógeno
PSE	Pale, soft and exudative
UFC	Unidad formadora de colonia

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Principales enfermedades transmitidas por los alimentos.....	92
Anexo 2.	Cepas aisladas de <i>L. monocytogenes</i> según tipo de muestra y grupo poblacional atendido en el Hospital San Bartolomé de Lima entre 2001 y 2005.....	100
Anexo 3.	Ubicación del centro frigorífico La Colonial.....	101
Anexo 4.	Kit de diagnóstico para <i>L. monocytogenes</i>	102
Anexo 5.	Valores críticos de la tabla chi cuadrado	102
Anexo 6.	Presencia de <i>L. monocytogenes</i> en canales bovinas (grupo 1).....	103
Anexo 7.	Presencia de <i>L. monocytogenes</i> en canales bovinas (grupo 2).....	104
Anexo 8.	Criterios microbiológicos para carnes	105
Anexo 9.	Criterios microbiológicos para Quesos	105
Anexo 10.	Criterios microbiológicos para Embutidos	106
Anexo 11.	Criterios microbiológicos para Frutas y hortalizas	106
Anexo 12.	Criterio microbiológico para los alimentos LPC en los que puede crecer <i>L. monocytogenes</i>	107
Anexo 13.	Criterio microbiológico para los alimentos LPC en los que no puede crecer <i>L. monocytogenes</i>	107
Anexo 14.	Criterios microbiológicos para carne picada.....	107

I. INTRODUCCIÓN

La carne es un alimento cuya composición hace que se pueda alterar fácilmente. Al tener una elevada actividad acuosa y ser un alimento rico en nutrientes, las bacterias encuentran en la carne un medio adecuado para crecer y multiplicarse (Pascual y Calderón, 2002).

Dentro de los agentes bacterianos encontrados en la carne tenemos a la *L. monocytogenes*, la cual es considerada como la única bacteria patógena que puede afectar al humano entre las seis especies actualmente reconocidas del género (Adams y Moss, 2008). La importancia de esta bacteria ha sido objeto de diversos estudios, en especial en la industria cárnica, ya que su alta tasa de mortalidad en las personas infectadas, la convierte en un riesgo potencial para los consumidores (Pérez *et al.*, 2008).

Esta bacteria crece a bajas temperaturas y predomina ya que la carne se mantiene constantemente a temperaturas de enfriamiento, por lo que el consumo de carne mal cocida puede ocasionar la presentación de Listeriosis sobre en personas inmunodeprimidas o mujeres gestantes (Adams y Moss, 2008).

La contaminación de la carne dependerá de las condiciones higiénicas durante la manipulación, así como de la contaminación del medio ambiente del centro de beneficio (Pascual y Calderón, 2002), por ello la conservación de la carne es un tema que ha hecho que los investigadores desarrollen diferentes fórmulas para poder extender el tiempo de esta. La descontaminación es un tratamiento para reducir el número de microorganismos patógenos en la superficie de canales; estos agentes descontaminantes no deben dejar residuos que puedan ser nocivos para la salud del consumidor ni modificar las características organolépticas de la carne fresca (Moreno, 2006).

Existen diferentes métodos de conservación para la carne y dentro de ellos está el empleo de ácidos orgánicos como el ácido láctico, los cuales son ampliamente usados como tratamiento de desinfección de canales en diferentes concentraciones (James, 2002).

Se ha utilizado con éxito en la descontaminación de carne de res, cordero, cerdo y aves de corral mediante técnicas de lavados y pulverizaciones. Algunos investigadores coinciden en que los ácidos orgánicos pueden reducir el número de microorganismos patógenos y de deterioro en la carne prolongando así la vida útil del producto (James, 2002).

Para las canales de mamíferos se aconseja que el tratamiento se realice antes del enfriamiento con soluciones de ácido láctico al 1% o 2% (Moreno, 2006). Diversos estudios han demostrado que el ácido láctico reduce la carga microbiana presente en las canales y carne de bovinos (Greer y Dilts, 1994; Castillo *et al.*, 1998; Ozdemir *et al.*, 2006). Estudios previos en los cuales se emplearon ácido láctico a una concentración del 2% muestran que la carne de vacuno pulverizada con ácido láctico antes de ser contaminado con *L. monocytogenes*, suprimen el crecimiento bacteriano debido a la actividad residual de los ácidos (Ellin, 1999).

Con el presente estudio se busca dar una nueva alternativa de desinfección en los centros de beneficio a nivel del Perú permitiendo obtener un producto inocuo con lo cual también se estaría disminuyendo el riesgo de presentación de la Listeriosis y dar una vida útil mayor a las canales, beneficiándose consumidores y productores respectivamente.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El alimento es toda sustancia, elaborada, semielaborada o bruta, que se destina al consumo humano (FAO, 2001) y que por sus componentes químicos y características sensoriales forma parte de la dieta diaria; cuyo fin es satisfacer el apetito. Es la materia prima que utiliza el organismo para extraer nutrientes y energía, necesarios para mantener al organismo en buen estado de salud y pueda así desarrollar sus procesos biológicos para el mantenimiento de funciones vitales; así como para el crecimiento, reposición de tejidos y equilibrio dinámico en el organismo (Izquierdo y Veciana, 1999; Bello, 2010).

Los alimentos pueden clasificarse según diversos criterios: por su composición pueden ser glucosídicos, lipídicos o proteicos; por su función pueden ser energéticos, plásticos o reguladores y por su origen pueden ser alimentos de origen animal o vegetal (Bello, 2010).

Los alimentos de origen animal son fuente importante de proteínas de alto valor biológico, dentro de ellos tenemos: carnes, pescados, huevos y derivados. Dentro de las carnes se incluyen carne de bovino, ovino, porcino, caprino, camélido, ave y peces (Izquierdo y Veciana, 1999).

En el Perú la información recopilada por la Encuesta Nacional de Presupuestos Familiares (ENAPREF), puesta a disposición por el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) y ejecutada en el período comprendido entre Mayo de 2008 y Abril de 2009, mostró que el consumo per cápita de carne bovina fue en promedio de 5.6 Kg/persona/año y específicamente para la ciudad de Lima fue de 5.32 Kg/persona/año (Cuadro 1) con un incremento en el año 2011 cuyo valor en el consumo per cápita de carne de res fue de 5.8 Kg/persona/año (MINAG, 2014).

Cuadro 1: Consumo promedio per cápita anual de carne por ámbito geográfico, según principales tipos de carne (kg/persona)

Principales tipos de carne	Total	Lima ¹	Resto país	Área urbana		Región natural		
				Urbana	Rural	Costa	Sierra	Selva
Aves de corral	0.6	0.0	0.9	0.4	1.5	0.2	0.6	2.7
Carne de carnero	1.7	0.4	2.3	1.3	2.8	0.5	4.1	0.3
Carne de cerdo	1.0	0.8	1.0	1.0	0.9	0.9	0.9	1.3
Carne otras aves ²	0.4	0.8	0.2	0.5	0.1	0.7	0.1	0.1
Carne de vacuno	5.1	5.3	5.1	5.9	2.7	6.1	3.8	4.8
Carnes varias ³	0.9	0.1	1.2	0.6	1.7	0.3	1.8	0.9
Gallina	0.6	0.8	0.5	0.7	0.4	0.9	0.2	0.6
Menudencias ⁴	3.5	4.7	2.9	3.9	2.0	3.9	2.9	3.0
Pollo	17.4	26.1	13.4	21.0	4.9	24.0	8.5	11.9

¹ Incluye provincia de Lima y la Provincia Constitucional del Callao

² Incluye carne de pato, pavo, codorniz y otros

³ Incluye carne de alpaca, cabrito, conejo, cuy, mono, venado y otros

⁴ Incluye menudencias de ave, res y otros.

Fuente: INEI, 2014

2.1. CARNE BOVINA

La carne comprende principalmente los tejidos musculares, también incluye órganos como el corazón, el hígado y los riñones (Adams y Moss, 2008). Aporta valiosos nutrientes para la salud humana, proporcionando todos los aminoácidos esenciales (lisina, treonina, metionina, fenilalanina, triptófano, leucina, isoleucina y valina), así como vitaminas, minerales y diversos micronutrientes como Omega 3 y ácido linoleico conjugado importantes para el crecimiento y desarrollo humano (Blandino, 2005; Gallo y Mamani, 2011).

2.1.1. Estructura y composición de la carne

Las propiedades sensoriales y las relacionadas con la salud y nutrición, se encuentran entre los factores de motivación más importantes para el consumo de carne. Los parámetros más importantes considerados en la evaluación de la calidad de la carne son color, jugosidad, ternura y sabor (Lawrie y Ledward, 2006; Gallo y Mamani, 2011).

Estructuralmente la carne se compone de fibras musculares; las cuales son células multinucleadas, largas, delgadas y ligeramente tubulares. Se encuentran rodeadas por una membrana llamada sarcolema. En la parte interna del sarcolema se encuentran las miofibrillas, que están recubiertas por túbulos y vesículas llamadas retículo sarcoplásmico, que intervienen en la contracción y relajación muscular. Cada miofibrilla se compone de delgados filamentos de proteína llamadas actina y miosina (Amerling, 2001).

La carne está constituida por un 75% de agua, casi el 20% de su peso son proteínas; la grasa varía según los cortes y grado de cebamiento del animal en los siguientes rangos: 5-7% en carnes magras; 10-15% para las carnes con poca grasa y 15-25% para las muy grasosas (Blandino, 2005). Además posee un 1.5% de sustancias nitrogenadas no proteicas, 1% de carbohidratos y alrededor de 1% de compuestos inorgánicos entre los que sobresalen el calcio, el magnesio, potasio, sodio, hierro, fósforo, azufre y cloro (Ordoñez y De la Hoz, 1999).

La composición de la carne depende de la especie, edad, sexo, alimentación y zona anatómica del animal (Cuadro 2 y 3).

Cuadro 2. Composición química aproximada de la carne

Animal	Pieza	Agua	Proteína	Grasa	Cenizas
Cerdo	Paleta	74.9	19.5	4.7	1.1
	Solomillo	75.3	21.1	2.4	1.2
	Chuleta*	54.5	15.2	29.4	0.8
	Jamón	75	20.2	3.6	1.1
	Panceta	40	11.2	48.2	0.6
Vacuno	Pierna	76.4	21.8	0.7	1.2
	Lomo*	74.6	22	2.2	1.2
Pollo	Muslo	73.3	20	5.5	1.2
	Pechuga	74.4	23.3	1.2	1.1

* Con tejido adiposo adyacente
Valores en porcentajes
Fuente: Belitz *et al.*, 2009

Cuadro 3. Composición química de las carnes (según zona de la canal) y despojos comestibles, correspondientes a ganado porcino, vacuno y ovino

Especie animal	Humedad	Proteínas	Lípidos	Cenizas
Porcino				
Pierna	59.8	17.7	20.2	0.9
Chuleta	60.4	16.4	21.7	0.9
Espalda	60.1	17.0	22.0	0.9
Hígado	71.8	20.1	5.7	5.7
Riñones	76.3	16.5	5.2	5.2
Corazón	76.8	16.9	4.8	4.8
Lengua	65.9	15.1	18.3	18.3
Vacuno				
Lomo	67.6	20.8	9.8	1.0
Solomillo	73.1	21.2	4.0	1.2
Pierna	71.2	21.2	7.2	1.0
Costillar	58.7	19.2	20.3	0.9
Espalda	69.5	29.8	9.3	1.0
Hígado	69.9	19.7	3.1	1.4
Riñones	76.1	16.6	5.1	5.1
Corazón	75.5	16.8	6.0	6.0
Lengua	66.8	16.0	15.9	15.9
Ovino				
Pierna	64.5	17.4	17.3	0.9
Chuletas	55.9	16.0	26.8	0.8
Espalda	62.8	17.1	19.2	0.9
Hígado	70.4	21.2	4.0	4.0
Riñones	78.5	16.5	3.0	3.0
Corazón	72.0	16.8	10.0	10.0
Lengua	69.2	13.5	14.8	14.8

Valores en porcentajes
Fuente: Bello, 2010

2.1.2. Obtención de la carne

El sacrificio de los animales debe ser de forma humanitaria. Los animales deben estar sanos y fisiológicamente normales y deben ser conducidos a los corrales de descanso para recuperar la energía perdida durante el transporte, en lo posible toda la noche, sobre todo si han viajado durante muchas horas o largas distancias; este descanso ante mortem permite también identificar a los animales lesionados o poner en cuarentena a los enfermos (D.S. N° 015-2012-AG).

El proceso de beneficio de los animales se desarrolla en centros autorizados y consta de una serie de procedimientos (Figura 1).

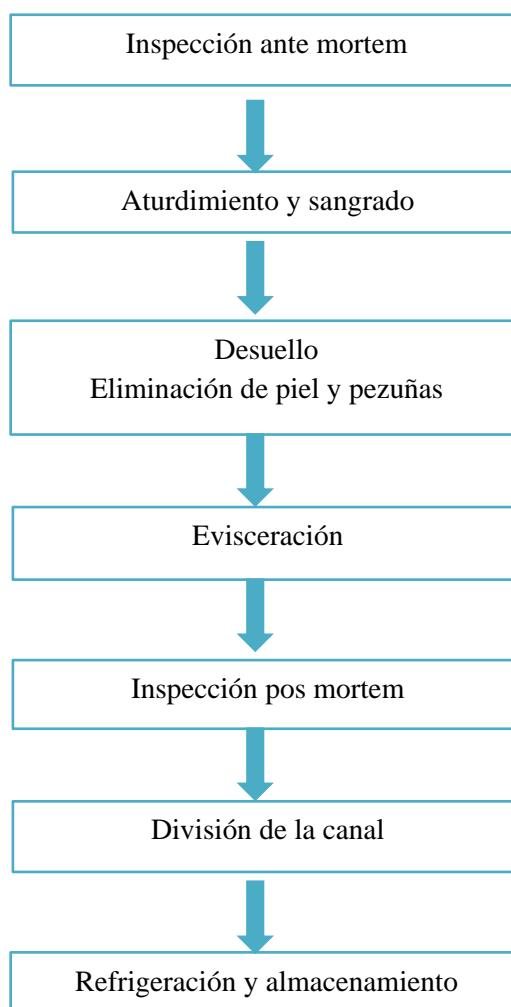


Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de beneficio (FAO, 2014)

El día del beneficio, serán trasladados al corral de encierro donde se realizará la ducha ante mortem, la cual tiene por finalidad eliminar la suciedad del cuerpo del animal, relajar al animal y producir la vasoconstricción periférica que ayudará a tener una mejor sangría. Posteriormente se realizará el aturdimiento, el cual debe dejar inconsciente al animal antes del sacrificio, con el fin de evitar el dolor, el estrés y la incomodidad del procedimiento (FAO, 2001, D.S. N° 015-2012-AG).

Una vez realizado el aturdimiento se realiza la sangría, por medio del corte de los principales vasos sanguíneos del cuello, produciéndose la muerte por anoxia cerebral, debido al shock hipovolémico, el tiempo mínimo que demora esta actividad es de seis minutos por bovino, luego se separan la cabeza y las pezuñas y se da inicio al desuello (D.S. N° 015-2012-AG).

Después del desuello, se realiza la evisceración torácica y abdominal. Luego las canales se dividen en dos, seccionándolas a través de un corte longitudinal a lo largo de su línea media dorsal, estas medias canales obtenidas se lavan y se retocan extrayendo la grasa y fascia que malogra el aspecto externo de la canal. Posteriormente las medias canales pasan a la zona de oreo para su enfriamiento, clasificación y finalmente ingresan a la sala de refrigeración para su conservación (FAO, 2001; D.S. N° 015-2012-AG).

2.1.3. Cambios post mortem en la carne

En el momento en que muere el animal, los diversos tejidos continúan su actividad metabólica; aunque el músculo ya no se contrae activamente, consume energía para mantener la temperatura y la integridad de las células.

2.1.3.1. Rigidez cadavérica

Inmediatamente después de la muerte del animal, los músculos aun contienen Adenosin trifosfato (ATP), sin embargo al establecerse un ambiente de anaerobiosis cesa el suministro de oxígeno y con ello la fosforilación oxidativa (Guerrero, 2004).

La falta de oxígeno en el músculo provoca que el ATP se agote y no pueda regenerarse; por ello se da origen a la glucólisis anaerobia post mortem, aquí el glucógeno en vez de degradarse en agua y dióxido de carbono con generación de ATP, se transforma en ácido láctico con producción mínima de ATP (Amerling, 2001).

El ácido láctico producido origina un descenso del pH muscular hasta valores entre 5.4 y 5.8 aproximadamente para el músculo bovino. A medida que desciende el pH y se agotan las reservas de ATP, se instala el proceso de *rigor mortis*, en donde el músculo se hace inextensible debido a que los filamentos de actina y miosina se entrecruzan de forma irreversible, ya que no cuenta con energía suficiente para la relajación, formando el complejo actino-miosina que mantiene contraído al músculo (Amerling, 2001; Guerrero, 2004; Adams y Moss, 2008).

Además, el descenso de pH debido al ácido láctico hace que las proteínas miofibrilares sean más susceptibles a la desnaturalización y provoca también que las proteínas alcancen un punto isoelectrico que se manifiesta por una reducción en la capacidad de retención de agua lo que determinan la exudación del músculo (Guerrero, 2004).

En los animales con hambre o sometidos a stress la reserva de glucógeno es débil, por consiguiente después de la muerte hay un rápido descenso del contenido del ATP del músculo y la rigidez es máxima (Amerling, 2001).

2.1.3.2. Cambios en el pH

El pH post mortem de la carne es muy importante para la vida útil de esta, ya que va a ser un factor que determina el crecimiento de los microorganismos (Adams y Moss, 2008). El pH de la carne bovina oscila entre 5.1 y 6.2 y va a depender de la cantidad de glucógeno presente en el músculo antes del beneficio (Amerling, 2001). Por ello, en animales sometidos a ayuno prolongado, stress o fatigados la cantidad de glucógeno muscular es baja, por lo tanto el ácido láctico producido es poco, obteniéndose valores de pH elevados, lo cual favorece la multiplicación microbiana y disminuye la vida útil de la carne (Gallo y Mamani, 2011).

Se ha comprobado que la velocidad del descenso del pH en el músculo y su valor final va a ser determinante en la calidad de la carne como materia prima, de acuerdo a ello existen tres tipos de modificaciones (Amerling, 2001):

- ***Descenso lento y gradual del pH***, hasta valores finales de 6.5, da como consecuencia carnes oscuras, textura firme y apariencia seca (DFD), este tipo de carne se produce por la pérdida de glucógeno muscular ante mortem y son susceptibles al desarrollo de microorganismos por su elevado pH.
- ***Descenso gradual del pH*** hasta un valor de 5.7 en aproximadamente 8 horas y valores finales de pH entre 5.3 y 5.7 dan como resultado carnes con color, textura y apariencia normal.

- **Descenso rápido del pH** hasta un valor bajo de 5.1 seguido de una ligera elevación de 5.3 a 5.6 produce carnes de color pálido, textura suave y exudación intensa (PSE), como consecuencia del descenso brusco del pH lo cual produce desnaturalización de las proteínas. Esto se presenta en animales sometidos a stress.

En el Cuadro 4 se observan que el descenso del pH es de manera gradual y más rápida durante las primeras 12 horas post mortem para luego estabilizarse a las 24 horas con un valor de pH entre 5.4 y 5.7 (Mariño *et al.*, 2005).

Cuadro 4. Valores estimados del pH cárnico obtenidos en toros de la raza Holstein y Nelore durante las primeras 24 horas post mortem

Horas post mortem	Holstein		Nelore	
	pH	IC ¹	pH	IC ¹
1	6.82	0.00	6.71	0.00
2	6.55	0.00	6.46	0.00
3	6.33	0.00	6.24	0.01
4	6.14	0.01	6.05	0.01
5	5.97	0.01	5.89	0.01
6	5.84	0.01	5.75	0.01
7	5.73	0.01	5.65	0.01
8	5.64	0.01	5.56	0.01
9	5.58	0.01	5.50	0.02
10	5.53	0.02	5.45	0.02
11	5.50	0.02	5.42	0.02
12	5.48	0.02	5.40	0.02
13	5.48	0.02	5.39	0.02
14	5.48	0.02	5.39	0.02
15	5.49	0.02	5.40	0.03
16	5.51	0.02	5.41	0.03
17	5.53	0.03	5.43	0.03
18	5.55	0.03	5.44	0.03
19	5.57	0.03	5.45	0.03
20	5.59	0.03	5.46	0.04
21	5.60	0.03	5.46	0.04
22	5.60	0.03	5.45	0.04
23	5.59	0.03	5.43	0.04
24	5.57	0.04	5.40	0.04

¹ Intervalo de confianza del 95%
Fuente: Mariño *et al.*, 2005

2.1.3.3. Maduración de la carne

La carne se convierte en un medio adecuado para el crecimiento microbiano debido al aumento del pH ocasionada por los cambios autolíticos de los componentes nitrogenados, por el ablandamiento y jugosidad de los tejidos que van a dar como resultado un producto más tierno y aromático (Moreno, 2006).

Se producen: cambios en las estructuras de las miofibrillas y de las proteínas miofibrilares con el debilitamiento del enlace actino-miosina, desnaturalización del pigmento muscular (mioglobina) por oxidación del hierro adquiriendo el pigmento el color marrón llamado metamioglobina y un aumento de la capacidad de retención de agua (CRA) por parte del músculo (Amerling, 2001). También está acompañada por reacciones como la oxidación de los lípidos, que pueden dar origen a los olores indeseables y a la formación de nucleótidos como amoníaco, sulfuro de hidrógeno y acetona; los que según su concentración favorecerán el color y el aroma de la carne. Sin embargo todos los cambios autolíticos darán con el tiempo la alteración de la carne (Amerling, 2001; Moreno, 2006).

2.2. CONTAMINACIÓN Y DETERIORO DE LA CARNE

La industria cárnica en general se ha caracterizado por falta de higiene en el manejo de las canales durante el beneficio, esto genera un sin número de problemas de calidad y convierte a la carne en una importante fuente de enfermedades (Ojeda y Vásquez, 2009).

2.2.1. Origen de la contaminación

El contaminación de la carne puede tener origen en las diferentes etapas del beneficio como son: la sangría, desuello, eviscerado y despiece de las canales, que facilitan la contaminación por medio del contacto de las canales con materia fecal, tierra, pelos, piel, etc. (Moreno, 2006). Asimismo, cuando el animal está muerto algunas bacterias patógenas atraviesan la barrera intestinal y llegan a los músculos contaminándolos (Pascual y Calderón, 2002; Carrillo y Audisio, 2007; Elmali *et al.*, 2012).

Además la contaminación puede tener origen, en las diferentes áreas del centro de beneficio por donde pasa la canal como los pisos, paredes, mesas, cuchillos y manos de los operadores en la planta de faena y en los lugares donde se almacena y vende se puede producir la contaminación de la carne (Pascual, 2005; Adams y Moss, 2008). Los equipos utilizados, la

higiene y desinfección del centro de beneficio y la higiene personal de los trabajadores son factores que afectan la carga microbiana de la carne (Elmali *et al.*, 2012).

La intensidad con que se origina la contaminación dependerá de las prácticas de manipulación que se cumplan en cada planta de sacrificio (Bravo, 2004; Moreno, 2006; Ojeda y Vásquez, 2009).

2.2.2. Microbiología de la carne

La profundidad del músculo de un animal recién sacrificado contiene una flora microbiana muy escasa que proviene generalmente del intestino y es transportada al músculo por la sangre. Sin embargo, la parte superficial de la carne, está contaminada por una flora diversa, que depende de las condiciones higiénicas del beneficio y de la sala de beneficio, la manipulación y el ambiente de almacenamiento (Pascual y Calderón, 2002).

La contaminación es muy variable y pueden incluirse algunos microorganismos patógenos como *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium botulinum*, que provienen de la flora intestinal o del medio ambiente (Norrung *et al.*, 2009). También se incluyen *Pseudomonas spp.*, *Moraxella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Flavobacterium spp.*, entre otras (Nortje *et al.*, 1990).

La contaminación trae repercusiones desfavorables siendo de dos tipos: La primera que tiene incidencia en salud pública y es producida por patógenos como: *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* enteropatógeno, *S. aureus*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Listeria monocytogenes* y la segunda producida por la flora saprofita que causa alteración del producto dentro de estas bacterias tenemos a: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, etc. Por ello es importante y necesario contar con un tratamiento higienizante terminal (Moreno, 2006).

2.2.3. Condiciones para la proliferación microbiana

La carne es un medio rico en nutrientes tales como carbono, nitrógeno, vitaminas, etc., necesarios para el crecimiento de los microorganismos, además presenta una serie de condiciones favorables para las bacterias que estimula el crecimiento y multiplicación de estos

microorganismos con el consiguiente incremento de la población microbiana (Sofos, 1994; Amerling, 2001).

Los factores que influyen en el crecimiento de los microorganismos en las carnes son: actividad de agua (A_w), el pH, el potencial de óxido-reducción (E_h), las necesidades nutritivas y la temperatura (Amerling 2001; Pascual y Calderón, 2002; Pascual, 2005).

2.2.3.1. Actividad de agua (A_w)

Se define como la cantidad de agua libre en el alimento, es decir, el agua disponible para el crecimiento de microorganismos y para que se puedan llevar a cabo diferentes reacciones químicas (Amerling, 2001). El valor de la A_w en la carne fresca por lo general se encuentra cerca de 0.98 a 0.99, cifras favorables para la multiplicación microbiana, por lo que la hace susceptible a la alteración por microorganismos (Price *et al.*, 1994; Amerling, 2001).

Las bacterias crecen a valores de A_w comprendidos entre 0.75 y 1.0 y las levaduras y mohos pueden crecer lentamente a valores de A_w de 0.62 como mínimo (Amerling, 2001; Gallo y Mamani, 2011).

Las variaciones en la A_w de la superficie de la carne (relacionada con la humedad relativa y la temperatura) tiene repercusiones sobre el crecimiento microbiano superficial; todo descenso en la A_w , supone una desecación que se opone a la multiplicación microbiana, de ahí la importancia de disminuir esta A_w (Price *et al.*, 1994; Amerling, 2001). En la figura 2 se observa el descenso de la A_w con relación a la temperatura.

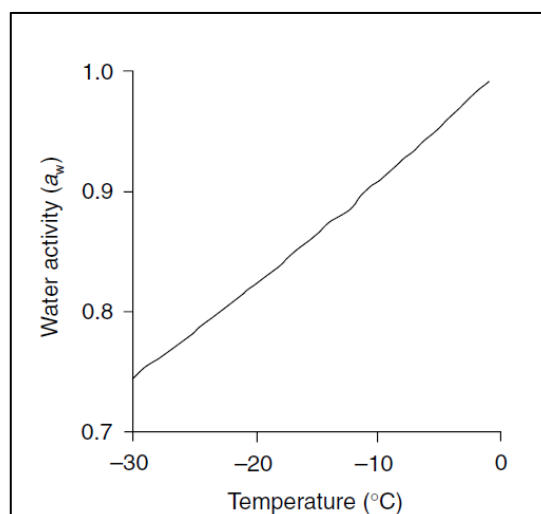


Figura 2. A_w de carne a diferentes temperaturas bajo cero (James S y James C, 2002)

Podría pensarse entonces que debería descartarse la conservación de la carne en ambientes húmedos, sin embargo, el ambiente seco asociado con el frío, que provoca una buena inhibición microbiana, trae consigo problemas como pérdida de masa y por consiguiente pérdidas económicas (Price *et al.*, 1994; Amerling, 2001).

La capacidad de retención de agua determina la pérdida de peso, principalmente por liberación de jugos, que se producen en toda la cadena de distribución y transformación de la carne, pudiendo también afectar la calidad de la carne, especialmente en términos de jugosidad y palatabilidad (Amerling, 2001; Gallo y Mamani, 2011).

2.2.3.2. El pH

El pH es un parámetro importante relacionado con la susceptibilidad de la carne a su deterioro y se usa para decidir sobre el tipo de procesamiento al que se va a destinar la carne (Gallo y Mamani, 2011).

El pH del músculo en vivo está cerca de la neutralidad, sin embargo después de la muerte desciende rápidamente hasta alcanzar, después de la rigidez cadavérica, valores entre 5.4 y 5.8 (en condiciones normales) con un rango que oscila entre 5.1 y 6.2 (Price *et al.*, 1994, Amerling, 2001).

Cada microorganismo tiene un pH de crecimiento óptimo, mínimo y máximo. La mayoría de las bacterias crecen mejor a un pH casi neutro, algunas bacterias se ven favorecidas por medios ácidos (acidófilas) y otras crecen bien en medios alcalinos. (Amerling, 2001).

Los microorganismos que normalmente alteran la carne, crecen mejor en condiciones de pH próximos a 7.0 o ligeramente alcalinos. Los microorganismos son extremadamente sensibles a las variaciones del pH y cualquier disminución en el pH aunque sea pequeña, determina una disminución de la velocidad de crecimiento de los microorganismos (Amerling, 2001; Gallo y Mamani, 2011).

A un pH bajo las bacterias son los microorganismos más afectados, luego las levaduras y los más resistentes a este pH bajo son los mohos quienes crecen en un pH comprendido entre 4.5 y 5.5. Por lo tanto esto significa que las carnes con valores de pH elevados están más expuestas a las acciones microbianas (Price *et al.*, 1994).

2.2.3.3. El Potencial de óxido-reducción (Eh)

Inmediatamente después de la muerte del animal, el músculo todavía contiene en profundidad reservas de oxígeno, que hacen que el Eh sea positivo y elevado, lo que favorece el crecimiento de gérmenes aeróbicos como *Pseudomonas* y *Micrococcus* (Price *et al.*, 1994).

Luego las reservas de oxígeno se agotan y el Eh profundo disminuye y se hace negativo; esta condición es propicia para el desarrollo de microorganismos anaerobios de la putrefacción como *Clostridium*. Otros microorganismos denominados anaerobios facultativos pueden desarrollarse en presencia o ausencia de oxígeno y los más representativos en la carne son los *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Estafilococcus* y *Coliformes* (Price *et al.*, 1994).

2.2.3.4. Necesidades nutritivas

Los nutrientes de la carne necesarios para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos superficiales no son un buen medio nutritivo inmediatamente después de su obtención, ya que no son de fácil acceso debido a las barreras que son necesarias penetrar previamente (pared celular, tejido conjuntivo, aponeurosis, grasa de cobertura, entre otros).

La penetración de los microorganismos en la carne, en las canales o en piezas gruesas es lenta; por el contrario, en carnes despiezadas o picadas es bastante fácil (Sofos, 1994).

Después de haber transcurrido en el músculo los procesos bioquímicos posteriores a su obtención, este aporta los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de la mayoría de los microorganismos. Satisface desde las necesidades tan simples de la *Escherichia coli*, hasta los complejos requerimientos nutricionales del *Streptococcus faecium* (Price *et al.*, 1994; Amerling, 2001).

2.2.3.5. Temperatura

La temperatura del músculo inmediatamente después del sacrificio es relativamente alta; aproximadamente 37°C; ideal para el desarrollo de la mayoría de las bacterias patógenas como *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Escherichia coli* que se desarrollan a temperaturas comprendidas entre 25 y 40°C, sin embargo es posible encontrarlas hasta en 10°C (Price *et al.*, 1994; Sofos, 1994).

Generalmente, una vez obtenidas las canales estas son refrigeradas y estas condiciones se mantienen en los procesos posteriores de corte, almacenamiento y comercialización. Es común encontrar microorganismos contaminantes llamados psicrófilos como *L. monocytogenes*; que son bacterias que pueden crecer a temperaturas comprendidas entre 10 y 30°C como temperatura óptima, pero pueden crecer más lentamente a temperaturas de refrigeración incluso hasta los 0°C) (Sofos, 1994).

2.2.4. Deterioro de la carne

Un indicio de deterioro en la carne fresca es la producción de los olores que se vuelven evidentes cuando el número de microorganismos alcanzan alrededor de 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC), esto debido a que el metabolismo bacteriano produce una mezcla compleja de sustancias como ésteres volátiles, alcoholes, cetonas y compuestos que contienen azufre, los que dan el mal olor a la carne (Adams y Moss, 2008).

La primera indicación de deterioro es el olor a mantequilla o queso, asociado a compuestos producidos a partir de glucosa por miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, bacterias ácido lácticas y *Brochothrix thermosphacta*. Luego las *Pseudomonas* comenzarán a aumentar en importancia y la carne adquiere un olor dulce y afrutado debido a la producción de una gama de ésteres, por esterificación de ácidos y alcoholes producidos durante la primera fase del deterioro. A medida que la glucosa se agota, la carne desarrolla un olor pútrido cuando *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y algunas especies de *Moraxella* producen compuestos volátiles de azufre tales como metano tiol, dimetil sulfuro y disulfuro de dimetilo (Adams y Moss, 2008).

En las etapas posteriores de descomposición el aumento en el pH de la carne es detectado como amoníaco y se desarrollan aminas como la putrescina y cadaverina. Cuando la flora microbiana alcanza números de 10^8 UFC, se hace evidente una mucosidad en la superficie de la carne, lo cual es una prueba más de deterioro (Adams y Moss, 2008).

2.3. LA CARNE COMO FUENTE DE ETA

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) son un problema que reviste importancia a nivel mundial. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2013) y el Centro para el control y prevención de Enfermedades (CDC, 2011), anualmente se presenta un gran número de personas afectadas por estas enfermedades debido al consumo de alimentos contaminados.

Las ETA son un síndrome originado por la ingestión de alimentos o agua, que contengan agentes infecciosos como bacterias, virus, hongos, parásitos que en la luz intestinal pueden multiplicarse o lisarse y producir toxinas las que pueden invadir la pared intestinal y desde allí alcanzar otros órganos o sistemas afectando la salud del consumidor ya sea a nivel individual o grupos de población (GUIA VETA, 2001; Bravo, 2004).

Como se observa en la Figura 3, hay factores que influyen en la calidad de los alimentos facilitando su contaminación y en el desarrollo de ETA.

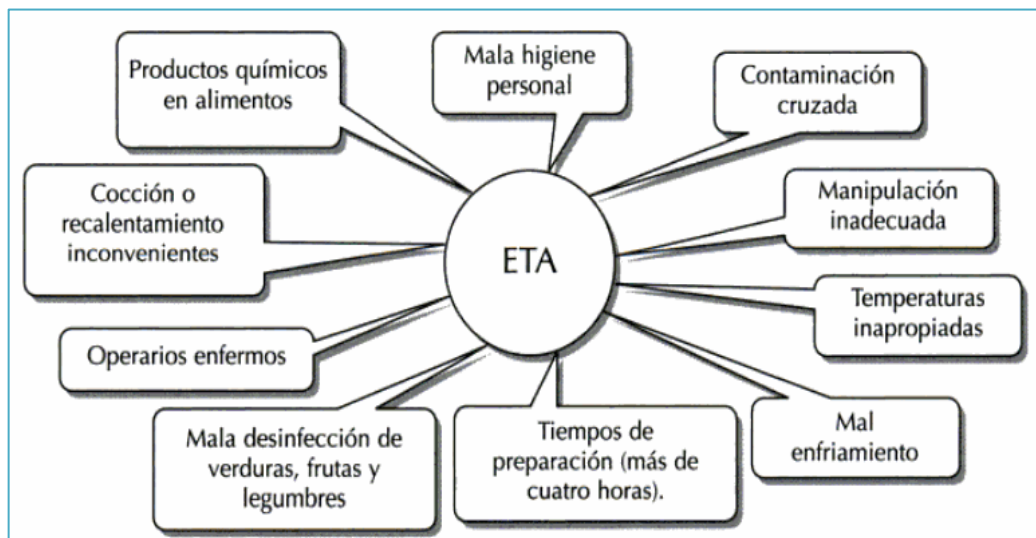


Figura 3. Factores que ocasionan la presentación de una ETA (Bravo, 2004)

Dentro de la clasificación de las ETA (Cuadro 5) las infecciones bacterianas causadas por: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella*, *Clostridium perfringes* tipo A, *Listeria spp.*, son las reportadas con mayor frecuencia (Pascual, 2005).

Cuadro 5. Clasificación de las ETA

Infecciones	Intoxicaciones
Virus	Plantas y animales venenosos
Bacterias *	Sustancias químicas
Parásitos	Sustancias radiactivas
Hongos	Biotoxinas

*Ver Anexo 1

Fuente: GUIA VETA, 2001

Los tejidos de un animal sano están protegidos contra cualquier infección por una combinación de barreras físicas e inmunológicas. En consecuencia, los órganos internos, los músculos y la canal de un animal recién sacrificado deben estar libres de microorganismos, sobre todo patógenos (Adams y Moss, 2008).

El número de microorganismos detectados en los tejidos asépticos son por lo general menos de 10 UFC por kg, aunque existen estudios que indican que estos números aumentan en condiciones de estrés. Las áreas del cuerpo del animal que por lo general están más densamente colonizadas son la piel, que posee una población microbiana mixta de micrococos, estafilococos, pseudomonas, levaduras y mohos, así como microorganismos provenientes de fuentes como la tierra o las heces, y el tracto gastrointestinal (Adams y Moss, 2008).

La contaminación de la canal puede ser causada por los microorganismos presentes en el contenido gastrointestinal o por una contaminación cruzada producida por equipos o personal del área de faena (Pérez *et al.*, 2008). Por ello la carne bovina está considerada como el origen de la diseminación de patógenos como *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *C. perfringens*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*, las cuales se pueden encontrar en las superficies de las carnes crudas, pudiendo aumentar el número de estas por una inadecuada manipulación (Amerling, 2001; Carrillo y Audisio, 2007).

2.4. ETA PRODUCIDA POR LISTERIA

La Listeriosis es una ETA cuya presentación se puede deber a diferentes factores como: fallas en la cadena de frío de los alimentos potencialmente peligrosos, conservación de alimentos a una temperatura de incubación óptima para los agentes microbianos, fallas en el proceso de cocción o calentamiento de los alimentos, malas prácticas de higiene personal en los manipuladores de alimentos, uso de materias primas contaminadas; si estos factores se manejan de forma adecuada se podrían prevenir las ETA. (Bravo, 2004; Pascual, 2005).

2.4.1. Clasificación del género Listeria

Durante muchos años el género *Listeria* se agrupó en ocho especies: *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. murrayi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. denitrificans*. Luego de haber realizado la secuenciación de rRNA 16S, *L. denitrificans*, es excluida del género *Listeria* y colocada en el género *Jonesia* (en el orden Actinomycetales, clase Actinobacteria) (Datta, 2003; Allen y Koneman, 2008).

Por secuenciación de los otros miembros del género *Listeria* se han identificado dos líneas de descendencia estrechamente relacionadas pero distintas, un primer grupo denominado *L. monocytogenes*, conformado por: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri* y el segundo grupo conformado por *L. grayi* / *L. murrayi*, el cual se ha combinado en una especie única *L. grayi*, por lo que ahora el género *Listeria* incluye a seis especies (Rocourt y Buchrieser, 2007; Allen y Koneman, 2008).

De las seis especies de *Listeria* que existen, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son los únicos patógenos reconocidos; donde *L. ivanovii* es principalmente un patógeno animal y *L. monocytogenes* es patógeno para el ser humano (Murray *et al.* 2006; Adams Moss, 2008). Sin embargo, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, y *L. ivanovii* han sido asociadas ocasionalmente con enfermedades humanas (Adams y Moss, 2008).

2.4.2. *Listeria monocytogenes*

Es un patógeno que se desarrolla intracelularmente y es causante de la Listeriosis. Es una bacteria ácido-tolerante y anaerobia facultativa. Estos bacilos aparecen de forma aislada, en parejas o en cadenas cortas y se pueden confundir con *Streptococcus pneumoniae* o *Enterococcus*, lo cual reviste importancia debido a que tanto *S. pneumoniae* como *L. monocytogenes* pueden producir meningitis (Brock *et al.*, 2003; Murray *et al.*, 2006).

2.4.2.1 Serotipos

Dentro de *L. monocytogenes* se encuentran 13 serotipos clasificados en base a los antígenos somáticos (S) y flagelares (H) (Cuadro 6).

La mayor parte de las enfermedades producidas por esta bacteria se debe a los serotipos 4b, 1/2 a, 1/2 b, los cuales han sido aislados en más del 90% de los casos de listeriosis humana y animal (Low *et al.*, 1993; Allen y Koneman, 2008).

Entre las serovariedades las cepas 4b causan más del 50% de los casos de listeriosis en todo el mundo, las cepas del grupo antigénico 1/2 (1/2 a, 1/2 b y 1/2 c) son las que predominan en los aislamientos a partir de alimentos. Esto sugiere que el serotipo 4b están más adaptadas a tejidos de hospedero mamífero que las cepas del serotipo 1/2 (Low *et al.*, 1993).

Cuadro 6. Serotipos de especies de *Listeria*

<i>Listerias sp.</i>	Serotipos
<i>L. monocytogenes</i>	½ a, ½b, ½c 3a, 3b, 3c 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	6a, 6b, 6c
<i>L. welshimeri</i>	6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	½ a, 4c, 4d, 6b

Fuente: Pascual y Calderón, 1999

2.4.2.2 Distribución

Esta bacteria crece en un amplio rango de ecosistemas; se encuentra de forma ubicua en la naturaleza, tanto en el suelo como en la vegetación en descomposición, en agua fresca y en aguas residuales, también forman parte de la materia fecal de muchos mamíferos (Torres *et al.*, 2005; Allen y Koneman, 2008), sobre todo en los animales de granja como los rumiantes quienes pueden ser portadores sanos de *L. monocytogenes* y eliminar la bacteria en las heces (Norrung *et al.*, 2009). Esta bacteria también ha sido aislada de diversas fuentes ambientales y en muestras de heces de aves, peces, insectos y otros animales (Aguado *et al.*, 2006).

Esta bacteria es contaminante frecuente de plantas procesadoras de alimentos, llegando a contaminar las superficies que contactan con los alimentos; incluido el producto mismo; coloniza a los seres humanos y a diversas especies de animales, causando zoonosis (Brock *et al.* 2003; Aguado *et al.* 2006; Jay *et al.* 2009; AESAN, 2011).

L. monocytogenes tiene habilidad para adherirse a las superficies formando biopelículas de exopolisacáridos generándose así resistencia a los procesos de limpieza y desinfección. Ello facilita la contaminación no sólo de los alimentos sino de equipos y de utensilios en las plantas procesadoras (Gallego *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2008).

La formación de biopelículas es un proceso dinámico y complejo que conlleva el ataque, colonización y crecimiento de microorganismos. En primer lugar, las moléculas orgánicas de los alimentos se depositan en la superficie de los equipos y formar una película acondicionado. En segundo lugar, los microorganismos biológicamente activos son atraídas a las moléculas orgánicas. En tercer lugar, las células microbianas persistentes permanecen

después de la limpieza y desinfección e iniciar el crecimiento. Por último, las formas de biopelículas con la expresión de genes celulares (Figura 4).

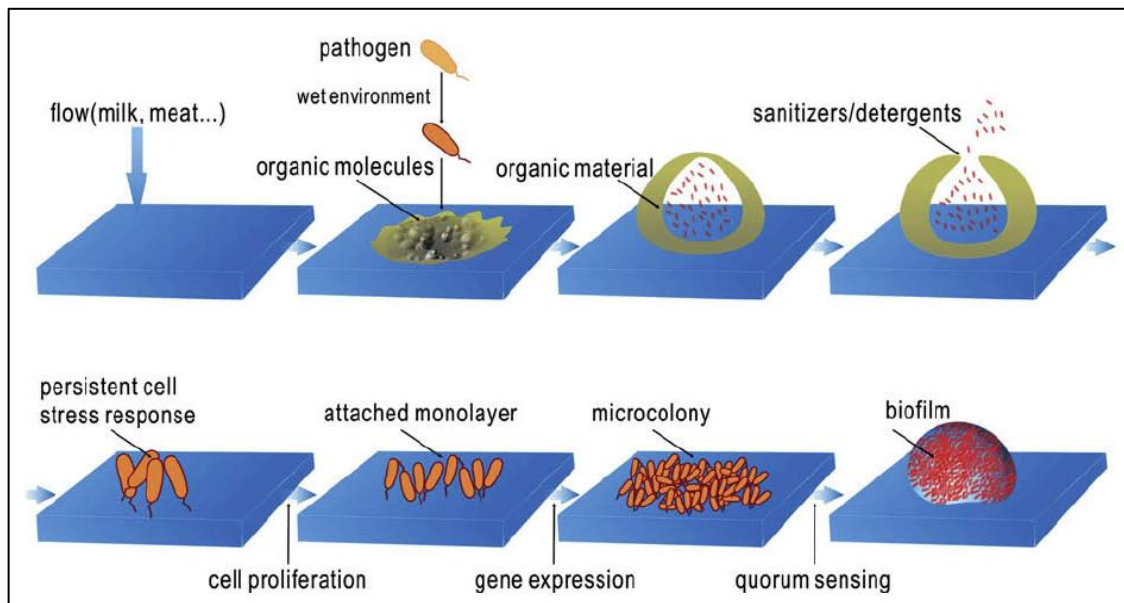


Figura 4. Proceso de formación de biopelículas (Dirckx y Davis, 2003)

2.4.2.3 Morfología

Es un bacilo Gram positivo, corto, recto o ligeramente curvado, de bordes redondeados. Mide entre 0.5µm–2µm de largo por 0.2µm–0.5µm de grosor, catalasa positivo, oxidasa negativo, no esporulado ni capsulado (Pumarola *et al.*, 1992).

L.monocytogenes se encuentra como unidades individuales, en pequeños grupos o en cadenas cortas, pudiendo estar dispuestas en forma de V o Y o en formas empalizadas. A veces, las bacterias tienen forma cocoide; con un promedio de 0.5 µm de diámetro; pudiendo ser confundidas con estreptococos (Rocourt y Buchrieser, 2007); dispuestas en forma de L, sobre todo en cultivos en medios con penicilina o glicina (Pascual y Calderón, 1999; Datta, 2003).

2.4.2.4 Movimiento

Se creía que *L. monocytogenes* tenía los mismos mecanismos que el *Vibrio cholerae* que usa sus flagelos para nadar contra el movimiento peristáltico que sigue el contenido intestinal y penetra la mucosa del intestino, donde se adhiere (Todar, 2012).

Curiosamente, a pesar de que *L. monocytogenes* a temperatura ambiente (20°C - 25°C), es activamente móvil; por sus flagelos peritricos; tiene un movimiento característico, basado en un lanzamiento rápido el cual se combina con salto y rotación (Pascual y Calderón, 1999; Todar, 2012).

A la temperatura corporal de 37°C, estos microorganismos no sintetizan flagelos, reduciéndose el número total de flagelos a uno o dos los cuales están situados por lo general en la región polar de la bacteria (Pascual y Calderón, 1999; Rocourt y Buchrieser, 2007; Todar, 2012). Por ello su virulencia está asociada a la capacidad de moverse hacia dentro de las células y entre las células del huésped, actividad que la realiza por medio de la polimerización de la actina; de las células infectadas; en un extremo de la bacteria denominándose a esta polimerización “colas crecientes de actina” las que ayudan a que pueda ser impulsada a través del citoplasma (Todar, 2012).

2.4.3. Factores que favorecen la proliferación de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes posee la capacidad de sobrevivir durante períodos prolongados en el ambiente (suelo, plantas y agua) y multiplicarse bajo ciertas condiciones (Cuadro 7).

Cuadro 7. Factores que impactan en el crecimiento y la supervivencia de *L. monocytogenes*

Factor	Puede crecer			Sobrevive pero no crece
	Límite inferior	Óptimo	Límite superior	
Temperatura (°C)	-1.5 - 3.0	30.0 a 37.0	45.0	-18.0
pH	4.2 a 4.3	7.0	9.4 a 9.5	3.3 a 4.2
Actividad de agua (Aw)	0.90 a 0.93	0.99	> 0.99	< 0.90
Concentración de sal (%)	< 0.5	0.7	12 a 16	≥ 20

Fuente: AESAN, 2011

Puede sobrevivir en el interior de los productos alimenticios, pudiendo crecer en las biopelículas ubicadas sobre la superficie de distintos alimentos, que han permanecido durante largos períodos de tiempo en malas condiciones de almacenamiento (Murray *et al.* 2006; Allen y Koneman 2008; Pérez *et al.*, 2008).

2.4.3.1. Requerimientos nutricionales

Crece muy bien en medios como: caldo de cerebro corazón, tripticasa de soja y triptosa. Requieren como mínimo de 4 vitaminas B (biotina, riboflavina, tiamina y ácido tioctico) y de aminoácidos (cisteína, glutamina, arginina, metionina, isoleucina, leucina y valina) para crecer. El crecimiento es estimulado por Fe^{+3} y la fenilalanina (Rocourt y Buchrieser, 2007; Jay *et al.* 2009).

2.4.3.2. PH

El crecimiento de esta bacteria se da a valores de pH que van desde 4.0 hasta 9.6, cuyo valor óptimo se encuentra entre 6.0 a 8.0 (Lado y Yousef, 2007). Algunos estudios como los realizados por Pascual y Calderón (1999) indican que *L. monocytogenes* se puede desarrollar entre valores de pH que van desde 5.0 hasta 9.0 siendo el óptimo 7.5, pero pasados estos límites su crecimiento se ve inhibido, aunque sobrevive. Sin embargo Rocourt y Buchrieser (2007) mencionan que *L. monocytogenes* crece entre pH 4.5 y 9.2 y de manera óptima a pH 7.

Aunque el crecimiento de *L. monocytogenes* a pH menor a 4.0 todavía no se ha documentado, este microorganismo parece ser bastante ácido tolerante. *L. monocytogenes* puede sobrevivir de 1 a 4 días en jugo de naranja cuyo pH es 3.6. El efecto del pH sobre la viabilidad celular, sin embargo, depende en gran medida de otros factores ambientales y del estado fisiológico del microorganismo (Lado y Yousef, 2007).

La ausencia de crecimiento y la disminución de la viabilidad celular puede ser observado a un pH menor o igual a 5.5, cuando otras condiciones ambientales (por ejemplo, temperatura) no son óptimas para la supervivencia de *L. monocytogenes* (Lado y Yousef, 2007).

2.4.3.3. Temperatura

El rango de temperatura que permite el crecimiento de *L. monocytogenes* es de particular interés para los procesadores de alimentos debido a que este patógeno es una bacteria psicotrópica. *L. monocytogenes* crece a temperaturas entre -1.5 y 45°C, en contraste, *L. innocua*, *L. murrayi*, y *L. grayi* que no pueden crecer a temperaturas por debajo de 1.7 (± 0.4), 2.8 y 3.0 °C, respectivamente (Lado y Yousef, 2007).

El límite de temperatura para *L. monocytogenes* está entre 1°C y 45°C, con una temperatura óptima que varía entre 30°C y 37°C, aunque entre 4°C y 5°C su crecimiento es más lento (Datta, 2003; Rocourt y Buchrieser, 2007).

L. monocytogenes, se desarrolla adecuadamente a temperaturas de refrigeración con un mínimo que puede estar entre 1.5°C y 3°C y un máximo de 45°C, esta capacidad le permite mantener la viabilidad en el interior o en las superficies de los alimentos que generalmente se conservan a bajas temperaturas (AESAN, 2011). Aunque *L. monocytogenes* raramente crece a una temperatura por debajo de 0°C, existen estudios que indican que sobrevive en alimentos almacenados por debajo de 0°C (Datta, 2003).

Esta característica de resistir bajas temperaturas es una propiedad peculiar de *L. monocytogenes*, lo que le permite multiplicarse a temperaturas bajas, por lo tanto, pueden crecer y acumularse en los alimentos contaminados almacenados en refrigeración. Por ello la listeriosis se asocia generalmente con la ingestión de productos lácteos, carne o vegetales que se han mantenido a temperaturas de refrigeración durante un período de tiempo (Todar, 2012).

Para que se destruya *L. monocytogenes* es necesario aplicar una temperatura de 70°C por 2 a 3 minutos en el centro del producto (Pascual y Calderón, 1999).

2.4.3.4. Humedad

La disponibilidad de la humedad para el crecimiento microbiano dependerá de la actividad de agua (A_w) del alimento. La alta osmolaridad, es decir, baja A_w , inhibe el crecimiento bacteriano ya que la bacteria necesita estar en un medio húmedo cuya A_w proporciona la fuerza que expande la célula bacteriana para el crecimiento de la pared celular y la división celular (Lado y Yousef, 2007).

L. monocytogenes crece a una A_w mayor o igual a 0.97, sin embargo, cuando se compara con otros patógenos transmitidos por alimentos, *L. monocytogenes* es una de las pocas bacterias que puede crecer con una A_w mínima o inferior a 0.93 (Rocourt y Buchrieser, 2007; Adams y Moss, 2008; Jay *et al.* 2009).

Aunque *L. monocytogenes* no parece crecer a una A_w menor de 0.90, la bacteria sobrevive por largos períodos en estas condiciones, sobre todo en refrigeración. Así tenemos que Lado y Yousef (2007), reportaron que esta bacteria sobrevivió en salami fermentado por 84 días a una temperatura de 4°C y con una A_w entre 0.79 y 0.86 (Lado y Yousef, 2007).

2.4.4. Listeriosis Humana

La listeriosis es una infección alimentaria gastrointestinal producida por *L. monocytogenes* que puede derivar en bacteriemia y meningitis (Brock *et al.*, 2003). Esta bacteria ha sido reconocida como un patógeno humano desde 1929, pero no se conocía la vía de transmisión hasta la década de 1980 cuando una serie de brotes indicaron que *L. monocytogenes* se transmitía por los alimentos siendo reconocida como una ETA. Actualmente se reconoce que casi todos los casos de listeriosis humana son transmitidas por los alimentos y a partir del año 2001 es de notificación obligatoria (Blackburn y McClure, 2002; Painter y Slutsker, 2007).

La enfermedad tiene un curso por lo general grave, dejando numerosas secuelas en las personas que la padecen. A pesar de la baja incidencia de la enfermedad, entre 2 a 4 casos por millón de habitantes en países occidentales, la listeriosis es una enfermedad grave y esto se refleja en la aparente alta tasa de mortalidad con un promedio del 30% de mortalidad (Blackburn y McClure, 2002).

Los alimentos contaminados son la mayor fuente de infección tanto en casos esporádicos como epidémicos. La dosis mínima requerida de *L. monocytogenes* para causar infección clínica en humanos no ha sido determinada, sin embargo el gran número (10^6) de *L. monocytogenes* detectadas en los alimentos responsabilizados de casos esporádicos y epidémicos de listeriosis sugiere que es alta (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

Niveles de 10^2 a 10^4 UFC de *L. monocytogenes* por gramo de alimento han sido asociados con listeriosis en humanos, especialmente en pacientes inmunosuprimidos, ancianos y mujeres embarazadas. Sin embargo, la dosis infectiva puede variar dependiendo de la patogenicidad y virulencia de la cepa involucrada, los factores de riesgo y susceptibilidad del hospedero, concentración del patógeno en el alimento y la cantidad de alimento contaminado consumido (Vázquez- Bolland *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2005).

Los alimentos implicados; según los estudios epidemiológicos realizados de varios brotes; a menudo contenían entre 10^3 y 10^6 UFC/g. Diversos estudios han determinado que la dosis infectiva en ratones alimentados por vía oral esta entre 10^3 y 10^8 UFC/g (Datta, 2003).

La enfermedad se presenta como brotes o casos esporádicos, tiene un período de incubación que puede ser algunas veces de varias semanas. Se plantea que los brotes tienen lugar de 3 a 70 días después de exposiciones aisladas a un producto sospechoso. Debido a los variados síntomas que ofrece la listeriosis y a su prolongado periodo de incubación se dificulta el diagnóstico al igual que conocer el vehículo transmisor, lo cual distingue a esta ETA (Blackburn y McClure, 2002).

2.4.4.1. Epidemiología

Aunque la listeriosis es una fracción muy pequeña de todas las ETA conocidas, es una causa importante de enfermedad grave, que representan aproximadamente el 3.8% de las hospitalizaciones y el 27.6% de mortalidad (Painter y Slutsker, 2007) pudiendo alcanzar entre el 30% al 40% de las muertes por enfermedades transmitidas por los alimentos (Datta, 2003).

Es una enfermedad esporádica que se ve durante todo el año, aunque su incidencia máxima ocurre en los meses más cálidos. Se ha calculado que cada año se producen alrededor de 2,500 infecciones, pero muchas de ellas son de carácter leve y por lo tanto no se registran (Murray *et al.*, 2006). Debido a ello a pesar de que la infección asintomática es bastante rara, siempre se debe sospechar en el caso de huéspedes inmunodeprimidos (Allen y Koneman, 2008).

Existen casos esporádicos (fuera de los brotes de transmisión alimentaria) en tasas anualizadas de menos de un caso por 100,000 habitantes, aunque la infección es más frecuente en los lactantes (10 casos por cada 100,000 habitantes) y los ancianos (1.4 casos por cada 100,000 habitantes).

La ingestión de *L. monocytogenes* a través de los diferentes alimentos puede ser habitual, aunque tras las regulaciones realizadas en la industria alimentaria su incidencia anual ha disminuido (4.4 casos por millón de habitantes actualmente en los Estados Unidos). En España, probablemente por el mismo motivo, la incidencia ha disminuido de 10.95 casos a 2.4 casos por millón de habitantes de 1990 a 1992 (Aguado *et al.*, 2006).

Dada la ubicuidad de la bacteria en los alimentos, es probable que los seres humanos tengan contacto diario con esta bacteria y ocurra una colonización transitoria en la mayoría de individuos; se estima que entre el 1 y el 5% de los individuos sanos son portadores y eliminan al patógeno en la materia fecal (Murray *et al.* 2006; Allen y Koneman 2008).

Estudios epidemiológicos realizados a partir de los brotes y la enfermedad esporádica han determinado que la infección con esta bacteria ha aumentado en los últimos 25 años en comparación con otras enfermedades de origen bacteriano y de transmisión alimentaria. Esto debido a que la listeriosis tiene una incidencia relativamente baja y un período de incubación largo, lo que hace difícil la identificación de los brotes. Sin embargo la mejora de la vigilancia, basada en la determinación de la bacteria por medio del laboratorio, está ayudando a superar esas dificultades (Painter y Slutsker, 2007).

2.4.4.2. Brotes y alimentos involucrados

La amplia distribución de *L. monocytogenes* en el medio ambiente y su capacidad para crecer en la mayoría de los alimentos no ácidos ofrece a esta bacteria muchas oportunidades para entrar en la cadena alimentaria y multiplicarse (Adams y Moss, 2008).

Las epidemias focales y los casos esporádicos de listeriosis se han asociado al consumo de muchos alimentos contaminados con esta bacteria que se aísla entre en el 15 al 70% de los vegetales crudos, leche y derivados, como quesos crudos, pescados, aves de corral y carne como la bovina (Aguado *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 2006).

Debido a que *L. monocytogenes* puede crecer en un amplio intervalo de pH, así como a temperaturas frías, los alimentos con un pequeño número de microorganismos pueden presentar una notable contaminación tras un período prolongado de refrigeración sobre todo si ello va acompañado de una mala cocción o el alimento fue preparado con mucha anticipación al consumo (Murray *et al.*, 2006).

La primera evidencia de que la listeriosis puede ser una ETA fue a raíz de un brote producido durante seis meses en 1981 en Nueva Escocia donde 34 casos fueron asociados al embarazo (el 27% de los niños nacidos vivos murió) y siete casos en adultos no gestantes (Painter y Slutsker, 2007; Adams y Moss, 2008). La cepa epidémica fue aislada en la ensalada de col almacenada en el refrigerador de un paciente y en dos paquetes sin abrir del producto. La evaluación del proceso de producción determinó que el vegetal provenía de una finca donde los campos de col habían sido fertilizados con estiércol de ovinos enfermos de listeriosis (Painter y Slutsker, 2007; Adams y Moss, 2008).

Un brote de listeriosis producido en 1983 en Massachusetts, determinó que la leche pasteurizada fue la responsable del brote que incluyó a 42 adultos y siete casos perinatales con una tasa de mortalidad global del 29%. La leche procedía de granjas donde se había producido un brote de listeriosis bovina, varios serotipos de *L. monocytogenes* fueron aislados en la leche cruda pero ninguno de ellos era la cepa epidémica. En este estudio se determinó que el proceso de pasteurización fue el adecuado y que la contaminación se produjo después de la pasteurización (Fleming *et al.*, 1985).

El brote más grande de listeriosis de América del Norte se produjo en el condado de Los Angeles, California, en 1985, durante 8 meses fueron detectados 142 casos; 93 fueron casos perinatales y 49 casos de adultos con una tasa de mortalidad global del 34% siendo el grupo más afectado el de las mujeres embarazadas. El producto contaminado fue un queso mexicano de

pasta blanda cuya producción presentaba una pasteurización deficiente y era además mezclado con leche sin pasteurizar (Linnan *et al.*, 1988).

Este brote sirvió para centrar la atención en los quesos blandos y desde entonces se han identificado otros incidentes, incluyendo un brote por consumo de queso suizo Vacherin Mont d'Or que abarca el período 1983-1987 donde se reportaron 122 casos y 31 defunciones; se afectaron a 65 mujeres embarazadas (y sus hijos) y 57 adultos la tasa de mortalidad fue del 32% y produjo secuelas neurológicas en el 30% de los supervivientes (Painter y Slutsker, 2007).

En un brote ocurrido en el año 2000, 13 casos de listeriosis fueron atribuidos al consumo de queso tipo mexicano elaborado a partir de la leche cruda contaminada. Del total de casos, 11 se trataban de mujeres embarazadas, en quienes la infección dio como resultado cinco partos con neonatos muertos, tres partos prematuros y tres nacidos infectados. Los investigadores aislaron *L. monocytogenes* serotipo 4b de los pacientes, del queso dulce disponible localmente y de la leche cruda destinada a los consumidores latinoamericanos en los Estados Unidos (MacDonald *et al.*, 2005).

En un ejemplo de brote multiestatal, 30 pacientes de 11 estados fueron los afectados y el alimento implicado fue la carne de pavo. Entre los enfermos, 22 casos (73%) fueron hombres o mujeres no embarazadas y ocho casos (27%) fueron mujeres embarazadas o parejas madre-hijo. La infección dio como resultado la muerte de cuatro personas, dos abortos y una muerte fetal. En este caso *L. monocytogenes* fue aislada de las muestras de productos provenientes de dos plantas ubicadas en diferentes estados que estaban relacionadas durante la fase de producción, además una de las plantas fue identificada como una fuente de listeriosis en 1989, lo que indica que esta bacteria puede persistir en una planta de carne y de forma intermitente puede contaminar los alimentos (Olsen *et al.*, 2005).

En 1992, un producto de carne listo para el consumo fue implicado en un brote de 279 casos de listeriosis, en Francia. Se reportaron que 92 casos (33%) estaban relacionados con el embarazo y 187 se produjo en mujeres adultas no embarazadas. Un estudio de los casos determinó que una marca de lengua de cerdo en gelatina fue el vehículo del patógeno que produjo la enfermedad (Goulet *et al.*, 1995).

En Francia en el año 1993, se produjo un brote de 39 casos que fueron asociados al consumo de rillettes (paté de cerdo). En 1995 se produjo un brote por el consumo de un tipo de queso Brie de Meaux que fue elaborado con leche cruda, 20 personas enfermaron (Goulet *et al.*, 1995).

En Gran Bretaña, en 1989 y 1990, los altos niveles de *L. monocytogenes* serotipo 4b en jamón envasado al vacío y en paté, determinaron la salida de ambos productos del mercado. Dos brotes europeos de listeriosis producidos en los años de 1998 y 2003 determinaron el retiro del producto que en este caso fue la mantequilla; considerado hasta hace poco como un alimento con un riesgo relativamente bajo (Adams y Moss, 2008).

En Chile en el año 2008 hubo cinco personas muertas y 119 afectadas debido al consumo de quesos blancos contaminados con esta bacteria (MINSAL, 2008). En el año 2011 en EE.UU 30 personas murieron y un total de 146 resultaron infectadas tras el consumo de melones enteros contaminados con *Listeria spp.* (CDC, 2011).

En Perú, Geldres (1957) publicó el primer aislamiento de *L. monocytogenes* de origen animal y Pereda *et al.* (1963) describieron el primer caso de listeriosis humana en el Perú.

2.4.4.3. Factores de virulencia de *L. monocytogenes*

De las especies de *Listeria*, *L. monocytogenes* es el patógeno que más preocupa en humanos por sus diversos factores de virulencia que están implicados en los procesos clave del ciclo intracelular de esta bacteria (Figura 5).

La adhesión y la invasión, de *L. monocytogenes* a la célula está comandada por la acción de proteínas expresadas en la superficie de la bacteria denominadas, internalinas. Las internalinas A (Inl A) y B (Inl B) están involucradas en la invasión a células no fagocíticas (Larraín y Carbajal, 2008), la primera interviene en la adhesión e invasión de células epiteliales polarizadas, como las intestinales, mientras que Inl B lo hace en el caso de células epiteliales no polarizadas, como los hepatocitos (López *et al.*, 2006).

La internalina interactúa con un receptor de adhesión llamada E-caderina, que se encuentra sobre las células epiteliales humanas localizadas en la matriz extracelular en relación con las uniones intercelulares, manteniendo las células pegadas entre sí, ella conduce a la inducción de la fagocitosis. Esta interacción promueve tanto la fijación específica como la entrada de *L. monocytogenes* en las células epiteliales (Allen y Koneman, 2008).

Una vez que *L. monocytogenes* se ha unido a su receptor, se produce la fosforilación y activación de una serie de proteínas intermedias en la célula del hospedero capaces de interactuar y reorganizar los filamentos de actina del citoesqueleto de la célula blanco lo que facilita la captación de la bacteria por la célula del hospedero mediante la endocitosis y

disgregación del epitelio para formar una vesícula llamada fagosoma (Larraín y Carvajal, 2008; Olivares, 2009).

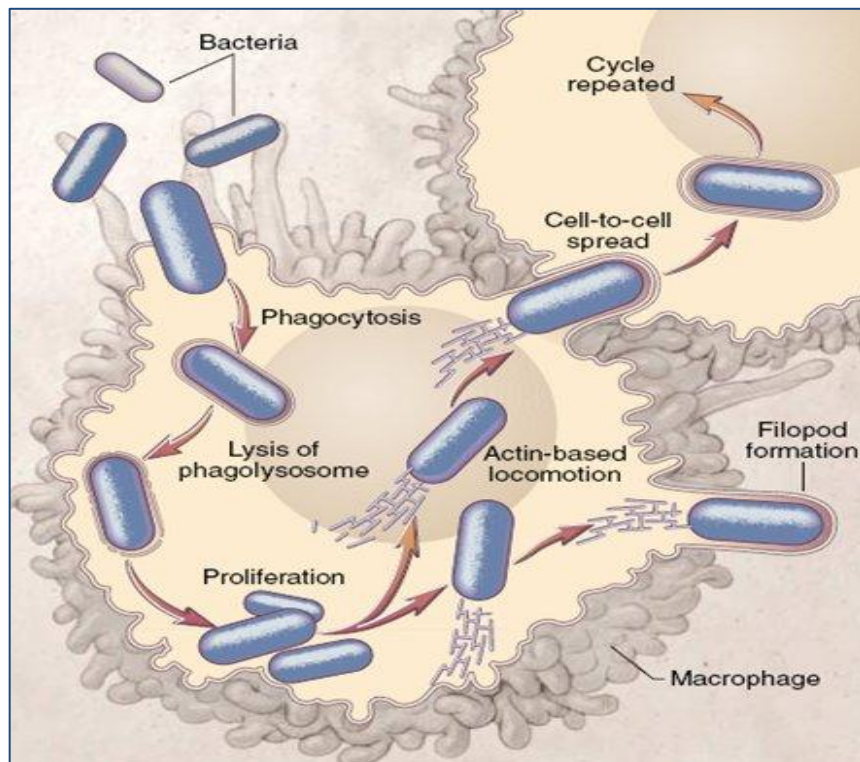


Figura 5. Infección por *L. monocytogenes* (Olivares, 2009)

En condiciones normales las bacterias una vez secuestradas dentro de estas vesículas son degradadas en los fagolisosomas (unión de fagosomas con lisosoma) debido a las condiciones adversas en el interior del fagolisosoma que no permiten la multiplicación bacteriana. Pero la supervivencia de *L. monocytogenes* en el fagolisosoma se debe a que produce listeriolisina O y dos enzimas diferentes de fosfolipasas C (una específica y otra de amplio espectro) que les permiten escapar del fagosoma antes de la fusión lisosómica, neutralizando los efectos de la explosión oxidativa fagocítica y evitando así la destrucción intracelular, (Murray *et al.*, 2006; Allen y Koneman, 2008; Todar 2012).

La listeriolisina O es activada por el pH ácido del fagolisosoma permitiendo el escape del fagolisosoma a través de la formación de poros, evitando la destrucción bacteriana y permitiendo el crecimiento y desarrollo microbiano en el citosol de la célula infectada (Murray *et al.*, 2006; Kuhn y Goebel, 2007; Larraín y Carvajal, 2008).

Luego la listeriolisina O es rápidamente ubiquitinizada y degradada por los proteasomas (lisosomas proteolíticos), antes de que pueda dañar la membrana plasmática. Existe evidencia

de que en ausencia de actividad de listeriolisina O, la bacteria disminuye notablemente su capacidad invasiva y no es capaz de reproducirse, al no poder escapar del fagosoma (Larraín y Carvajal, 2008).

Otra proteína de la superficie de la listeria (Act A) produce la polimerización intracelular de la actina para formar colas de actina que le permite a la *L. monocytogenes* desplazarse a través del citosol de la célula hospedera hasta llegar a la superficie de la membrana de la misma célula para formar proyecciones similares a pseudópodos (Allen y Koneman, 2008; Jay *et al.*, 2009). Estos pseudópodos, al tomar contacto con la célula vecina son fagocitados, quedando la bacteria incluida en los fagosomas de la célula vecina y lista para reiniciar un nuevo ciclo infeccioso (López *et al.* 2006; Kuhn y Goebel, 2007; Larraín y Carvajal, 2008).

El paso directo de célula a célula es crucial en la patogénesis de la infección y está determinada por las fosfolipasas C bacterianas que facilitan la propagación intercelular de las bacterias para invadir células vecinas no infectadas sin que tenga que salir de la parte interna de la célula del hospedero ni tener exposición a factores inmunitarios solubles, como anticuerpos y complemento (Murray *et al.*, 2006; Allen y Koneman, 2008; Jay *et al.*, 2009).

2.4.4.4. Fisiopatología de la infección

La patogenicidad de *L. monocytogenes* se debe a la capacidad para adherirse, invadir y multiplicarse dentro de una gran variedad de células no fagocíticas (Gilot *et al.*, 1999). Aunque la exposición a *L. monocytogenes* es indudablemente muy común; la enfermedad aguda, aunque es muy rara, se caracteriza por septicemia y meningitis, teniendo una tasa de mortalidad de 20% a 30%. Al año solo hay unos 2,500 casos de listeriosis aguda, pero de todos estos casos mueren unas 500 personas (Brock *et al.*, 2003).

L. monocytogenes es un patógeno multisistémico que puede infectar un amplio rango de tejidos en los hospederos (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). El periodo de incubación varía entre 11 y 70 días, con una media de tres a cuatro semanas (Aguado *et al.* 2006).

La infección (Figura 6) se inicia en los enterocitos o en las células M de las placas de Peyer tras la ingestión del microorganismo en los alimentos contaminados (exceptuando la transmisión vertical y la transmisión cruzada), *L. monocytogenes* puede sobrevivir a la exposición a enzimas proteolíticas, ácido gástrico y sales biliares gracias a la acción protectora

de los genes de respuesta al estrés (Torres *et al.*, 2005; Aguado *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 2006).

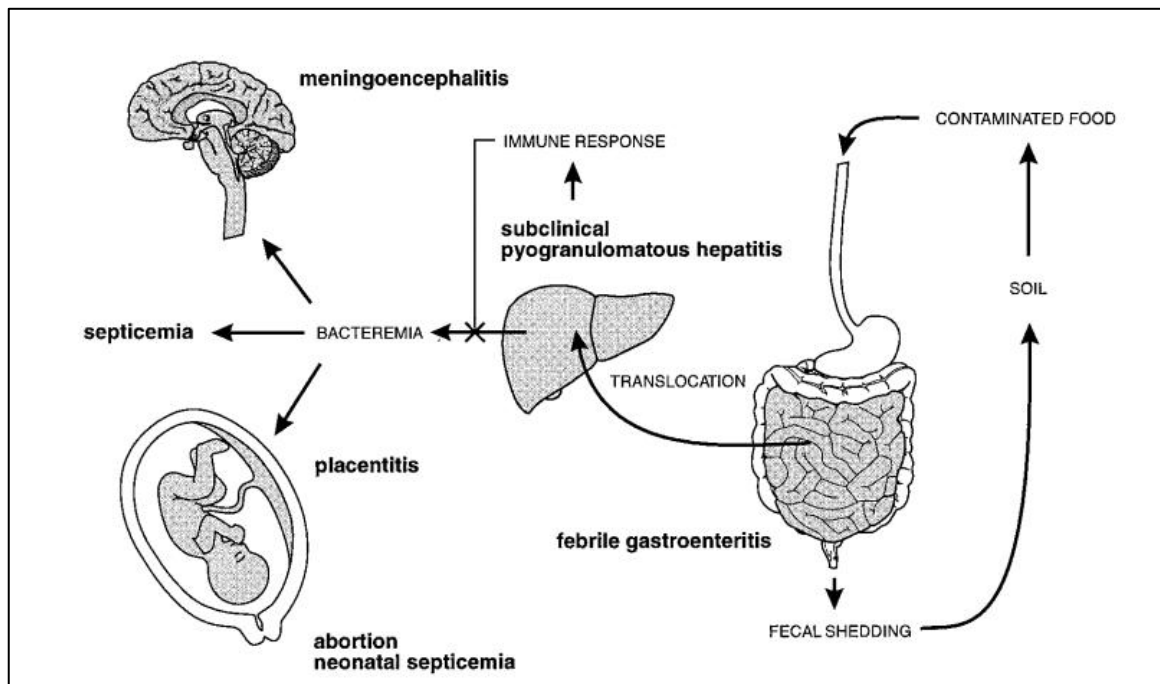


Figura 6. Representación esquemática de la fisiopatología de la infección por *Listeria* (Vázquez-Boland *et al.*, 2001)

Más del 90% de bacterias son acumuladas en el hígado donde el sitio principal de multiplicación bacteriana es el hepatocito (Torres *et al.*, 2005). Sin embargo, las principales formas clínicas de listeriosis muestran que este microorganismo posee tropismo por el útero grávido y el sistema nervioso central (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

El aborto y la muerte del neonato debido a *L. monocytogenes*, han sido reproducidos experimentalmente por inoculación intravenosa, oral y respiratoria de *Listeria* en animales gestantes susceptibles; de esta manera se demostró que la bacteria accede al feto por penetración hematológica de la barrera placentaria. La bacteria invade primero la membrana basal y progresa hacia el vello placentar, donde causa infiltración inflamatoria y necrosis (Abram y Doric, 1997).

En humanos la infección placentaria se caracteriza por numerosos micro abscesos y la colonización de la membrana trofoblástica a través de la barrera endotelial, esto permite a la bacteria alcanzar la corriente sanguínea fetal, produciendo una infección generalizada y la posterior muerte del feto en el útero o la muerte prematura del neonato infectado (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

En humanos, *L. monocytogenes* invade el cerebro por migración a lo largo de los nervios craneales y la infección del sistema nervioso central se presenta en forma de meningitis; sin embargo, esta meningitis está asociada frecuentemente con la presencia de focos infecciosos en el parénquima cerebral, especialmente en el tallo cerebral lo que sugiere que *L. monocytogenes* tiene tropismo por el tejido nervioso (Lorber, 1997).

2.4.4.5. Características clínicas de listeriosis humana

a. Grupo de Riesgo

La enfermedad está limitada a varias poblaciones bien definidas cuya presentación dependerá del estado del hospedador donde los más susceptibles son los neonatos, los ancianos, las mujeres embarazadas y los pacientes con deficiencia en la inmunidad celular (Murray *et al.*, 2006; Jay *et al.*, 2009).

La inmunidad humoral es relativamente poco importante debido a que se pueden replicar en los macrófagos y moverse en el interior de las células, evitando así la eliminación mediada por anticuerpos (Murray *et al.*, 2006). Por ello los individuos con inmunidad celular alterada son vulnerables a esta infección siendo especialmente susceptibles a las infecciones graves (Aguado *et al.* 2006; Murray *et al.*, 2006; Jay *et al.*, 2009).

b. Período de Incubación

El curso clínico de la infección usualmente comienza alrededor de 20 horas después de la ingestión del alimento contaminado. El período de incubación para la enfermedad invasiva es generalmente entre 20 y 30 días, en personas adultas es de tres a 70 días, en bebés infectados el período de incubación es de una a cuatro semanas después del nacimiento (Torres *et al.*, 2005).

c. Signos clínicos

La enfermedad puede atacar a una o varias personas (Cuadro 8), los síntomas pueden ser ligeros, con una duración de pocas horas, semanas o meses (GUIA VETA, 2001; Bravo, 2004).

Cuadro 8. Síntomas clínicos asociados con la infección por *L. monocytogenes*.

Población	Cuadro clínico	Diagnostico	Condición predisponente
Mujeres embarazadas	Fiebre, mialgia, diarrea Parto prematuro Aborto Muerte fetal	Hemocultivo Cultivo de líquido amniótico	
Recién nacidos:			
<7 días de edad	Sepsis, neumonía	Hemocultivo	Prematuro
≥7 días de edad	Meningitis, sepsis	Cultivo de líquido cefalorraquídeo	
Adultos no embarazadas	Sepsis, meningitis, infecciones focales	Hemocultivo. Cultivo de líquido cefalorraquídeo	Inmunosupresión edad avanzada
Adultos sanos	Diarrea y la fiebre	Cultivo en caldo de enriquecimiento selectivo	Posiblemente gran inóculo

Fuente: Painter y Slutsker, 2007

El curso de la enfermedad es usualmente bifásico, con una fase subfebril inicial de tres a 10 días en las cuales se presentan dolores de cabeza, desórdenes visuales, malestar general; seguida por una segunda fase de síntomas severos (Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2005).

Pueden distinguirse dos formas básicas de presentación de la listeriosis: listeriosis perinatal y listeriosis en el paciente adulto. En ambas instancias, las formas clínicas predominantes corresponden a infección diseminada o infección local en el sistema nervioso central (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

Una persona perteneciente al grupo de riesgo que padezca esta enfermedad presenta fiebre, dolores musculares y a veces síntomas gastrointestinales como náuseas y diarrea. Si la infección se extiende al sistema nervioso, puede aparecer dolor de cabeza, rigidez de cuello,

confusión, pérdida del equilibrio, convulsiones, meningoencefalitis, meningitis y septicemias que son a veces mortales (Pumarola *et al.*, 1992; Pascual, 2005; Murray *et al.*, 2006; Jay *et al.*, 2009).

En personas que no pertenecen a los grupos de riesgo o que consumen antiácidos regularmente, una infección elevada de *L. monocytogenes* les puede causar cuadros de gastroenteritis febril leve con signos similares a una gripe (Pascual, 2005; Murray *et al.*, 2006).

Una mujer embarazada afectada por *L. monocytogenes* puede presentar signos de una leve infección, que se manifiesta con fiebre ligera. Sin embargo puede transmitir la enfermedad al feto a través de la placenta o la infección la puede llevar a un aborto espontáneo, siendo más grave durante el segundo o tercer trimestre, debido a que produce partos prematuros, con fetos muertos o con serios problemas de salud en el recién nacido (Pascual, 2005; Jay *et al.*, 2009). La mujer puede portar el microorganismo en el tracto genital por algún tiempo, ocasionándole complicaciones en embarazos posteriores (Pumarola *et al.*, 1992; Torres *et al.*, 2005; Aguado *et al.*, 2006).

La infección neonatal por *L. monocytogenes* se puede manifestar en dos formas (Pumarola *et al.*, 1992): una listeriosis de inicio temprano cuyo período de incubación es de 15 días y la infección ocurre en el útero; se asocia con aborto espontáneo, nacimiento prematuro, bajo peso al nacer, bronconeumonía o septicemia al nacimiento, o muerte del recién nacido por una infección diseminada (Torres *et al.*, 2005; Jay *et al.*, 2009) y una listeriosis neonatal tardía que ocurre de una a ocho semanas post-parto; con síndrome febril acompañado por meningitis y en algunos casos gastroenteritis y neumonía, la mortalidad en casos de listeriosis neonatal es baja (10%-20%) con peso normal al nacimiento y ausencia de complicaciones maternas pero puede dejar secuelas como hidrocefalia o retardo psicomotor (Pumarola *et al.*, 1992; Lorber 1997; Torres *et al.*, 2005).

En el Perú, Pereda (1977) describió 20 casos de listeriosis perinatal detectadas durante las autopsias realizadas en la Maternidad de Lima y Guevara *et al.* (1979) publicaron la presentación de 17 casos de listeriosis en dos hospitales de Lima, donde señalan 8 casos perinatales e incluyen 7 cepas aisladas a partir de 653 muestras de heces (4 de *L. monocytogenes* y 3 de *L. innocua*). Así mismo Villegas en el año 2010 aisló 20 cepas clínicas de *L. monocytogenes* a partir de 18 casos de listeriosis perinatal que fueron atendidos en el Hospital Madre Niño San Bartolomé de Lima durante los años 2001 y 2005; de estas cepas cinco se

aislaron en gestantes en muestras de sangre y líquido amniótico y 15 en muestras de líquido cefalorraquídeo y secreción conjuntival en los recién nacidos (Anexo 2).

d. Mortalidad

La tasa de mortalidad de las infecciones sintomáticas por *Listeria* (20%-30%) es más alta que la de casi todas las restantes toxiinfecciones alimentarias (Murray *et al.*, 2006).

El porcentaje de mortalidad por infecciones en el sistema nervioso central es alrededor del 20% pero pueden llegar a elevarse hasta un 40% a 60% si está asociado con enfermedades recurrentes que debilitan el sistema inmune (Torres *et al.*, 2005).

Se ha estimado que en el 10% de la población que adquiere la meningitis bacterial ésta es causada por *L. monocytogenes*. Debido a la efectiva vacunación contra *Haemophilus influenzae*; *L. monocytogenes* es ahora la causa más común de infección meningeal en adultos después de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y el *Streptococo* del grupo B (Torres *et al.*, 2005).

Otra forma clínica frecuente de listeriosis en algunos pacientes, es la bacteriemia o septicemia (15% del 50% de los casos), con un porcentaje alto de mortalidad de hasta de 70%, si está asociado con enfermedades que debilitan el sistema inmune como en aquellos pacientes con cáncer, donde *L. monocytogenes* es la principal causa de meningitis bacterial (Torres *et al.*, 2005).

e. Diagnóstico, tratamiento y prevención

El diagnóstico de la listeriosis se realiza mediante el cultivo de *L. monocytogenes* a partir de la sangre o del fluido raquídeo. También puede ser identificada en los alimentos por cultivo directo o por una variedad de métodos moleculares (Brock *et al.*, 2003).

El tratamiento antibiótico con trimetropin-sulfametoxazol es efectivo; es sensible in vitro a penicilina, ampicilina, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol y gentamicina. Para el tratamiento de los cuadros de meningoencefalitis puede emplearse el cloranfenicol, y en inmunodeprimidos debe asociarse un aminoglucósido a la penicilina (Pumarola *et al.*, 1992).

Como medidas de prevención esta limitar la contaminación de los sitios de procesamiento de los alimentos, lavarse las manos con agua y jabón, lavar los utensilios de

cocina y superficies en contacto con alimentos crudos (mesas, tablas de picar, cuchillos, etc.), lavar los vegetales crudos, mantener la higiene de la heladera, evitar la contaminación cruzada entre alimentos crudos y cocidos o listos para consumir (Brock *et al.*, 2003).

Dado que *L. monocytogenes* es sensible al calor y a la radiación, los alimentos crudos y los utensilios que se emplean deben ser apropiadamente descontaminados. Sin embargo el riesgo de contaminación no puede ser eliminado debido a la amplia distribución del patógeno (Brock *et al.*, 2003).

2.5. PROCEDIMIENTOS Y MÉTODOS DE DESCONTAMINACIÓN DE LA CARNE

La descontaminación es un tratamiento microbicida aplicado a la carne fresca con la finalidad de conseguir una reducción en el número de microorganismos patógenos y saprófitos presente en la superficie de canales, despojos, despieces, etc. (Moreno, 2006). Los procesos para descontaminar la carne se clasifican en tres grupos (Cuadro 9).

Cuadro 9. Procedimientos de descontaminación de la carne

Físicos

Duchado o inmersión
Agua caliente, vapor de agua y vacío
Pasteurización por vapor
Radiaciones ionizantes
Ultrasonidos
Altas presiones
Iluminación instantánea de gran intensidad
Rayos infrarrojos

Químicos

Agua clorada
Ácidos orgánicos
Fosfato trisodico

Microbiológicos

Uso de bacterias lácticas y bacteriocinas

Fuente: Moreno, 2006

Además de su eficacia sobre los microorganismos, los agentes descontaminantes no deben dejar residuos que puedan ser nocivos para la salud del consumidor ni modificar las características organolépticas de la carne fresca (Moreno, 2006).

2.5.1. Procedimientos físicos

La cantidad de carga microbiana que se reduce con estos procedimientos será variable de acuerdo al método empleado (Cuadro 10).

Cuadro 10. Reducciones microbianas típicas alcanzadas por tratamientos no químicos en la descontaminación de carne.

Tratamiento	Reducción del conteo (log) (APCs)
Agua fría	1-2
Agua caliente	1-3
Vapor	2-4
Rayos ultravioleta	0-2
Iluminación	1-3
Radiaciones	1-2
Ultrasonido	0-1.5

APCs: Recuento de Aerobios en Placa

Fuente: James, 2002

2.5.1.1. Lavado o duchado con agua potable

Es una práctica tradicional que se realiza después de obtenida la canal, es un método que con el cual se pretende mejorar la presentación de la canal por eliminación de manchas de sangre y otras suciedades más que por arrastrar la flora microbiana contaminante (Moreno, 2006; Adams y Moss, 2008).

El lavado tendrá un efecto mínimo sobre la microflora de la superficie, se debe considerar que la calidad biológica del agua no siempre es la adecuada y que además esta extiende por toda la canal la carga microbiana que podría encontrarse en una determinada zona. Se aconseja que se use la menor cantidad posible de agua y que esta sea aplicada a elevada presión para que sean secadas rápidamente y luego sean sometidas al enfriamiento (Moreno, 2006; Adams y Moss, 2008).

2.5.1.2. Uso de agua caliente

Se busca potenciar la acción mecánica de arrastre y lavado por la acción del calor, ya sea por aspersión o inmersión. El inconveniente de la aspersión es que la temperatura del agua varía desde que sale del depósito hasta su llegada a la superficie de las canales. Otro inconveniente es el cambio de coloración por efecto del calor que desaparece luego de que las canales se someten a temperaturas de refrigeración de 1°C – 4°C. (Moreno, 2006; Adams y Moss, 2008). La inmersión de las canales de aves y mamíferos pequeños en depósitos de agua a temperaturas entre 60°C y 70°C por 1 ó 3 minutos, produce una reducción de la flora microbiana (Moreno, 2006; Adams y Moss, 2008).

La combinación tiempo temperatura más eficaz en la inactivación microbiana fue la de 71°C durante 6 minutos, pero la desventaja es que produce una cocción superficial esto en aves, para la carne bovina o de cordero la combinación temperatura tiempo más eficaz para la reducción microbiana, sin producir cambios permanentes en el aspecto fue la de 80°C durante 10 segundos (Moreno, 2006; Adams y Moss, 2008).

2.5.1.3. Pasteurización con vapor

El proceso comprende tres etapas; en la primera se lleva a cabo el secado de la superficie de las canales mediante chorros de aire comprimido, a continuación se someten al tratamiento en una cámara de vapor de baja presión a una temperatura media de 90.5°C por algunos segundos. Finalmente se enfría su superficie por aspersión de agua fría a 4.5°C, el proceso dura unos 30 segundos (Moreno, 2006).

2.5.1.4. Refrigeración

La refrigeración es el método más usado para conservar la carne, las temperaturas bajas retrasan el crecimiento, la actividad de los microorganismos como las reacciones químicas y enzimáticas causantes de las alteraciones que conllevan a problemas de salud en los consumidores (Amerling, 2001; Adams y Moss, 2008; Gil *et al.*, 2010).

La carne antes de la refrigeración contiene microorganismos que crecen a bajas temperaturas (psicrófilos), con una temperatura óptima de crecimiento de -2 a 7°C y microorganismos que crecen más lentamente a esas temperaturas (mesófilos) como son los *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y *Clostridium perfringes* (Amerling, 2001).

A temperaturas de enfriamiento, el crecimiento microbiano entre los sobrevivientes se limita a los psicrófilos presentes y estos pueden ser inhibidos aún más por el secado parcial que se produce de la superficie. Los organismos psicrófilos forman sólo un pequeño porcentaje de la microflora inicial, pero predominan posteriormente ya que la carne se mantiene constantemente a temperaturas de enfriamiento (Adams y Moss, 2008).

La velocidad del enfriamiento depende del tamaño de las canales, capacidad calórica y cobertura de grasa así como de la circulación del aire en las cámaras frigoríficas. Cuando las canales calientes se enfrían adecuadamente, las alteraciones generalmente se deben a los cambios que ocurren en la superficie, ya que esta se halla constituida por grasa y tejido conectivo; la consistencia de este último cambia durante el enfriamiento e impide que ocurran posteriores pérdidas de agua por evaporación (Amerling, 2001).

Para que los efectos de la refrigeración sean los adecuados, las canales deben ser refrigeradas inmediatamente después del sacrificio, ese enfriamiento debe ser rápido, ya que de lo contrario se puede producir una alteración denominada “putrefacción del hueso” que es una alteración que se presenta alrededor de los nódulos linfáticos situados en las partes profundas de las canales (Amerling, 2001).

La refrigeración lenta consiste en dejar la canal expuesta a la temperatura ambiente hasta llegar a una temperatura de 30 °C en la canal, para luego pasar esta al cuarto de refrigeración el cual tiene una temperatura de 5°C, circulación de aire y una humedad relativa del 80% que ayuda a disminuir las pérdidas por humedad. En 24 horas la temperatura baja a 7°C en las capas superiores, luego de esto son trasladadas al cuarto de conservación en la que se mantiene a una temperatura que esta entre 1 y 3°C. Luego de 30 horas, aproximadamente, la carne adquiere en su totalidad la temperatura del medio, debido a ello se manifiestan pérdidas de peso de un 5% y alteraciones por microorganismos y enzimas en la carne (Amerling, 2001).

Cuanto más baja sea la temperatura, más lentas son las reacciones químicas, enzimáticas, y el crecimiento bacteriano; pero produce también un alto potencial de óxido reducción en la superficie de la carne que es adecuada para el crecimiento de microorganismos aerobios psicrotróficos (James S. y James C, 2002).

2.5.1.5. Radiaciones ionizantes

Constituyen el procedimiento tecnológico con el que podría obtenerse el objetivo deseado para la carne refrigerada, permitirían eliminar los microorganismos o patógenos no

esporulados de procedencia entérica, a la vez de producir una reducción importante de los saprofitos alterantes, pudiéndose utilizar dosis algo mayores para la carne congelada (Ellin, 1999; Moreno, 2006). Esto en forma inocua para el consumidor en términos de radioactividad inducida y de formación de sustancias tóxicas y sin efectos desfavorables en las características organolépticas del producto (Moreno, 2006).

El inconveniente radica en que penetra solo de 1 a 2 cm por lo que no puede emplearse para piezas grandes de canales. Los factores externos, tales como la temperatura, la presencia o ausencia de oxígeno, y las condiciones de almacenamiento también influyen en la eficacia de la radiación (Ellin, 1999; Moreno, 2006).

2.5.1.6. Ultrasonido

Las canales son introducidas en agua sometiendo a la acción turbulenta de la misma, con esto se rompen las adherencias de las bacterias a la superficie de las canales. Una vez liberadas es preciso destruirlas por ejemplo durante el enfriamiento de las canales en agua fría clorada. Aunque su aplicación en canales es limitada, su empleo es posible para utensilios difíciles de limpiar por otros procedimientos. Actualmente el uso está limitado (Moreno, 2006; Gil *et al.*, 2010).

2.5.1.7. Altas presiones

Se ha ensayado con cortes de carne y carne picada, pero no con canales o medias canales, debido a su tamaño. Inactivan las formas vegetativas, pero no son efectivas frente a las esporas (Moreno, 2006).

2.5.1.8. Iluminación instantánea de gran intensidad

Consiste en iluminar la superficie a tratar con una intensidad luminosa 20,000 veces superior a la luz solar durante muy corto tiempo. El espectro luminoso emitido comprende el ultravioleta, el visible y el próximo al infrarrojo (Moreno, 2006).

2.5.1.9. Rayos infrarrojos

Eleva la temperatura de la superficie a 80°C – 150°C y reduce los recuentos hasta 50 veces, sin modificaciones apreciables. Sin embargo la necesidad de tratar cada canal al menos durante 60 segundos limita su utilización en los centros de beneficio con grandes ritmos de matanza (Moreno, 2006). Como la penetración de los rayos es pequeña en los líquidos e insignificante en alimentos sólidos; su uso se limita a destruir microorganismo que se encuentren sobre las superficies (Gil *et al.*, 2010).

2.5.2. Procedimientos microbiológicos

2.5.2.1. Utilización de bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos con diversas aplicaciones siendo una de las principales la fermentación de alimentos en las industrias lácteas y cárnicas; y para frenar el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes que se presenten en los alimentos (Moreno, 2006; Ghanbari y Jami, 2013).

La conservación de la carne puede realizarse a través del empleo directo de estas bacterias (productoras de ácido láctico por fermentación de azúcares) o bacteriocinas (compuestos antimicrobianos purificados o semipurificados) (Stiles, 1996; Minor, 1999).

Aun cuando con la aplicación directa o la producción *in situ* de ácido láctico ha logrado reducir el crecimiento de microorganismos patógenos y de descomposición como: *Escherichia coli*, *Pseudomona fragi*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*; no se produce inhibición del crecimiento de la flora nativa indeseable de las bacterias lácticas (algunas bacterias heterofermentativas productoras de ácido acético o cepas de *Lactobacillus sp.*, productoras de H₂S), además se pueden alterar propiedades funcionales como cohesividad, textura, capacidad de retención de agua y color debido a la caída del pH (Minor, 1998).

Las bacteriocinas ejercen su actividad antimicrobiana contra cualquier cepa incluyendo aquellas que son de la misma especie que el productor de la bacteriocina o a las especies más distantes. Las bacteriocinas son producidas naturalmente por lo que son más fácilmente aceptadas por los consumidores (Ghanbari y Jami, 2013).

Las BAL también tienen acción antimicrobiana por los productos propios de su metabolismo como: peróxido de hidrogeno (H₂O₂) que inhibe *Pseudomonas spp.* y *S. aureus*;

dióxido de carbono (CO₂). Estas sustancias crean un ambiente anaerobio alterando la permeabilidad celular e inhibiendo microorganismos de los productos cárnicos como son las Gram-negativas psicotrópicas; asimismo produce diacetilo; que es un componente de aroma; el cual es usado extensivamente en la industria láctea como un compuesto de sabor preferido y por sus propiedades antimicrobianas que son más activas contra bacterias gram-negativas, levaduras y mohos que contra bacterias gram-positivas (Ghanbari y Jami, 2013).

2.5.3. Procedimientos químicos

Los tratamientos químicos empleados (Cuadro 11) para eliminar patógenos alterantes de las canales pueden realizarse mediante el empleo de: ácidos orgánicos y sus sales, sorbato potásico y otros productos como antimicrobianos naturales (combinación de lisozima-EDTA y la activación del sistema lactoperoxidasa-tiocianato-peróxido de hidrógeno) (Reguera *et al.*, 1995).

Cuadro 11. Productos químicos investigados para descontaminar la carne

Producto química	Ejemplos
Ácidos orgánicos	Láctico, acético, fumarico, cítrico, ascórbico, fórmico, propionico, benzoico, sorbico
Cloro	Cloro gaseoso, hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio.
Dióxido de cloro	
Sorbatos	Sorbato de potasio, ácido sorbico
Polifosfatos	Ortofosfato trisodico (TSP), hexametafosfato de sodio, tripolifosfato de sodio, pirofosfato tetrasódico
Ozono	
Peróxido de hidrogeno	
Cloruro de potasio	
Lisozima	
Desinfectantes	Glutaraldehido, yodóforos,

Fuente: James, 2002

El efecto varía dependiendo del método empleado (Cuadro 12)

Cuadro 12. Reducciones microbianas obtenidas por tratamientos de descontaminación química de la carne

Tratamiento	Reducción del conteo (log) (APCs)
Ácidos orgánicos	1-3.5
Cloro	1-2
Dióxido de cloro	1-2
Fosfato trisodico	1-3
Ozono	0.5-3
Peróxido de hidrogeno	2-3

APCs: Recuento de Aerobios en Placa

Fuente: James, 2002

2.5.3.1. Agua clorada

El cloro posee escasa actividad sobre la superficie de las canales, ya que es fácilmente inactivado por la materia orgánica. El dióxido de cloro es más eficaz, ya que es activo en presencia de materia orgánica, pero solo puede utilizarse a concentraciones relativamente bajas por sus efectos adversos sobre los operarios (Moreno, 2006).

Puede emplearse mediante duchado, aunque no son eficaces las concentraciones bajas ya que el cloro es neutralizado por la materia orgánica de la superficie de la carne, observándose el efecto beneficioso por encima de 100 ppm de cloro libre, por lo que se aconseja concentraciones de hasta 200 ppm que es el nivel máximo autorizado en Estados Unidos y que es calificado como eficaz tanto en la reducción de los recuentos totales como el número de salmonellas sin que imparta malos olores (Moreno, 2006). El uso de agua clorada a 50mg/l también han demostrado reducir la microflora de la superficie (Adams y Moss, 2008).

2.5.3.2. Lactoferrina Activada (ALF)

Es una proteína extraída de la leche desnatada o suero se emplea como tratamiento antimicrobiano en canales, se aplica en forma de spray en reses sacrificadas y en cortes de carne cruda de ganado vacuno (Drago, 2007).

La habilidad que poseen las moléculas ALF en unirse fuertemente a las células bacterianas impidiendo la unión de estas bacterias a la superficie de los tejidos de animales inhibiendo de esta forma el crecimiento de la población (Drago, 2007), esta acción se debe a que provoca alteraciones en la membrana bacteriana que conduce a pérdida de su integridad y por lo tanto a la muerte de las bacterias (Martínez *et al.*, 2010).

2.5.3.3. Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos contribuyen al desarrollo de sabor, aroma y textura de los alimentos, pero también a su estabilidad mediante la inhibición de microorganismos alterantes (Requena *et al.*, 1995). Los ácidos orgánicos como acético, ascórbico, cítrico, fórmico, láctico, propiónico, peracético son ampliamente usados para tratamiento de desinfección de canales ayudando a controlar o disminuir la carga microbiana (Ojeda y Vásquez, 2009).

El efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos depende de: el efecto del pH y el grado de disociación del ácido. Esta acción antimicrobiana es debido a la reducción del pH (menor pH mayor efecto antimicrobiano) que ocasiona la acidificación del citoplasma bacteriano y a la acción de las moléculas del ácido orgánico no disociado (James, 2002).

Los efectos positivos de este tratamiento pueden concretarse en una reducción de una unidad logarítmica en el número de enterobacterias y de 2 a 3 unidades logarítmicas en la flora alterante, pero a nivel práctico pueden ser menores (1.5 unidades logarítmicas en los recuentos en placas de aerobios) (Moreno, 2006).

Se han utilizado con éxito en la descontaminación de carne de res, cordero, cerdo y aves de corral técnicas de lavados y pulverizaciones que contienen ácidos orgánicos. Algunos investigadores coinciden en que los ácidos orgánicos pueden reducir el número de microorganismos patógenos y de deterioro en la carne por lo general entre 1 a 3.5 unidades logarítmicas por gramo; prolongando así la vida útil del producto (James, 2002).

Sin embargo las reducciones producidas en los ensayos comerciales a menudo son significativamente más bajas que los encontrados en estudios de laboratorio. En los ensayos de laboratorio las muestras han sido inoculadas con altos niveles de bacterias y en estas situaciones los ácidos pueden ser más eficaces debido a que es mucho más fácil cubrir toda la superficie en una pequeña muestra por el ácido en el laboratorio que en toda una canal en el centro de beneficio (James, 2002).

La acción antimicrobiana de los ácidos orgánicos es mayor si se aplican con agua tibia a temperaturas de 50°C a 55°C como enjuague en las canales (Moreno, 2006), sin embargo en muchos casos, la carne se ha sumergido en la mezcla de ácido y es difícil separar el efecto de la temperatura de la del ácido (James, 2002).

Las repercusiones negativas como es el cambio de color de la grasa que se torna de un color gris oscuro, olores y sabores anormales; parecen que solo se producen a concentraciones mayores al 2% (Moreno, 2006). Algunos estudios mencionan que el empleo de ácido acético al 2% produce decoloración en lomos de canales de cerdo, en otros estudios el empleo de ácido acético al 3% no provocaron efectos adversos en muestras de vacas flacas, pero si sabores ligeros apagados y cambio de color de la grasa tornándose ésta a gris (James, 2002).

Sin embargo hay dos hechos negativos a considerar: el primero que los ácidos orgánicos producen daños subletales en las bacterias, de los cuales pueden recuperarse, y el segundo sobre el posible desarrollo de resistencia a estos ácidos (Moreno, 2006).

2.6. CONTROL DE LISTERIA MONOCYTOGENES EN CARNE

La contaminación de las carnes en plantas de beneficio por *L. monocytogenes*, puede tener como origen a los mismos animales los cuales la albergan a nivel de la glándula mamaria, el tracto intestinal o puede estar en el medio ambiente (Gallego *et al.*, 2005).

En la actualidad *Listeria monocytogenes* es una bacteria considerada importante ya que produce brotes de ETA. La repercusión más importante de estos brotes es en mujeres embarazas e individuos inmunodeprimidos en los cuales puede llegar a producir elevada mortalidad (Aguado *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2008).

En la última década, la presencia de *L. monocytogenes* en canales y centros de beneficio ha sido considerada como un indicador de que no se están realizando adecuadamente las operaciones sanitarias estándares (Gallego *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2008).

Como la superficie de la canal puede contaminarse con *L. monocytogenes* durante el beneficio, las soluciones de ácidos orgánicos han sido probados para retirar listerias de carne o inhibir su crecimiento durante el almacenamiento en refrigeración (Ellin, 1999), ya que un pH bajo tiene efecto adverso sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* pero no sólo el pH específico del medio es importante, sino también el tipo de ácido, la temperatura, y otros compuestos antimicrobianos que están presentes (Buchanan *et al.*, 1993).

2.6.1. Uso de ácido láctico

El ácido láctico es un compuesto muy versátil utilizado en la industria alimenticia, química, farmacéutica, textil, la agricultura, alimentación animal entre otros (Requena *et al.*, 1995; Marín, 2011).

Está incluido en la lista de los ingredientes GRAS (reconocidos generalmente como seguros) de la Food and Drug Administration (FDA). La Food Safety and Inspection Service (FSIS), permite el uso de ácido láctico como agente antimicrobiano en el lavado de canales bovinas antes del enfriamiento en concentraciones de 2.5 % y la utilización de soluciones al 5% a temperaturas que no excedan los 55°C, que pueden ser aplicadas antes o después de la etapa de enfriamiento de las canales. Sin embargo Moreno (2006) indica que las canales de vacuno no deben tratarse con concentraciones mayores de 1.25% pudiendo llegar hasta el 2% en casos de despieces primarios

Los efectos antimicrobianos del ácido láctico sobre *L. monocytogenes* se deben a dos mecanismos de acción:

2.6.1.1. Cambios en el pH

El efecto antimicrobiano debido a la acidez en sí, se debe a la disminución del pH extracelular. El pH ácido del medio ambiente tiene un efecto adverso en el crecimiento de *Listeria* ya que al igual que muchas otras bacterias, *L. monocytogenes* crece de manera óptima a un pH próximo a la neutralidad (Ellin, 1999; Doores, 2005).

2.6.1.2. Acción de la forma no disociada

Al ser un ácido débil este no se disocia totalmente en soluciones acuosas, ello va a depender de la constante de disociación (pKa), el cual en la mayoría de los ácidos orgánicos se encuentra a un pH entre 3 y 5 como se observa en el Cuadro 13; en este rango de pH el ácido se disocia en un 50% aproximadamente (Doores, 2005).

Cuadro 13. Constantes de disociación de ácidos orgánicos en soluciones acuosas.

Ácidos	pk1	pk2	pk3
Ácido acético	4.75		
Ácido dehidroacetico	5.27		
Diacetato de sodio	4.75		
Ácido adipico	4.43	5.41	
Ácido caprílico	4.89		
Ácido cítrico	3.14	4.77	
Ácido fumarico	3.03	4.44	
Ácido láctico	3.08		
Ácido málico	3.40	5.11	6.39
Ácido propionico	4.87		
Ácido succínico	4.16	5.61	
Ácido tartárico	2.89	4.34	

Fuente: Doores, 2005

Los ácidos orgánicos no disociado son 10 a 600 veces más eficaces en la inhibición y eliminación de microorganismos en comparación con sus formas disociadas; que al ser un anión es altamente polar y por lo tanto no atraviesa la membrana plasmática de los microorganismos; por el contrario su forma no disociada es muy soluble en los componentes de las membranas celulares por lo que puede introducirse a través de ellas (James, 2002).

Una vez en el interior de la bacteria, el ácido se disocia, esto provoca el incremento de protones en el interior celular lo que interfiere con las funciones celulares (Ostling y Lindgren, 1993; Requena *et al.*, 1995; Ghanbari y Jami, 2013).

La disociación del ácido en el interior de la bacteria ocasionan que la concentración interna de aniones aumenten y se desencadene un mecanismo de compensación de la carga eléctrica que obliga a la bacteria a aumentar los niveles de Na^+ y K^+ , lo que lleva a un mayor aumento de la fuerza iónica intracelular y del turgor, originando un gran aumento de la presión mecánica sobre la pared del microorganismo, lo que hace que eventualmente estalle (Bearson *et al.*, 1997), se provoca el descenso del pH interno, lo cual causa a su vez desnaturalización de las proteínas y la desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo así con la viabilidad (Requena *et al.*, 1995).

Diversos estudios concluyen que el efecto antibacterial del ácido láctico varía dependiendo de la concentración del ácido, la temperatura de la solución, el método y el tiempo de contacto (Rahman, 2003). En general, el tratamiento con soluciones de ácido láctico al 2% aplicado a una temperatura de 37 °C sobre la superficie de la carne se ha descrito como óptimo (James, 2002).

Diversos estudios han demostrado que el ácido láctico reduce la carga microbiana presente en las canales y carne de bovinos (Greer y Dilts, 1994; Castillo *et al.*, 1998). Por ejemplo estudios realizados por Özdemir *et al.*, 2006, reportaron que el ácido láctico al 1 y 2% fueron efectivos para la reducción de *L. monocytogenes* y *Salmonella typhimurium* en carne contaminada, Pipek *et al.* (2004) realizaron un estudio usando dos métodos de descontaminación de canales aplicando primero vapor de agua entre 90 a 95°C seguido del pulverizado con ácido láctico al 2% obteniendo una reducción en las UFC de psicrófilos y mesófilos durante el almacenamiento en frío.

2.6.2. Uso de otros perseverantes para controlar *L. monocytogenes* en carne

Dado que *L. monocytogenes* puede crecer en una variedad de productos cárnicos procesados a temperaturas de refrigeración, una variedad de productos químicos que destruyen o limitan el crecimiento de microbios se han probado para la conservación de la carne.

2.6.2.1. Cloruro de sodio (NaCl)

Si se adiciona en el medio de crecimiento o en los alimentos puede ser una fuente de estrés osmótico mediante la disminución de la A_w , sin embargo *L. monocytogenes* es muy tolerante y es capaz de soportar altas concentraciones de sal en comparación a *Salmonella spp.* y *Yersinia spp* (Ellin, 1999).

Un experimento realizado para determinar el efecto de las soluciones de salmuera por inmersión determinó que *L. monocytogenes* sobrevive seis horas a 10°C en soluciones que contienen 6, 16, o 26% de cloruro de sodio. En combinación con otros compuestos usados en el curado en las carnes, NaCl es un factor que contribuye a la destrucción o inhibición de *L. monocytogenes* (Ellin, 1999).

2.6.2.2. El nitrito.

Solo no es un agente antilisterial muy eficaz. Así tenemos que una solución de 30 ppm de nitrito de sodio a un pH de 6.2, aplicado por inmersión a canales de pavo fue incapaz de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* a una temperatura entre cuatro a 25°C. En carne de vacuno, se requiere 800 ppm para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*. Sin embargo, como con sal, en presencia de otros agentes de curado, el nitrito puede contribuir a la eliminación de *L. monocytogenes* en temperaturas de refrigeración (Ellin, 1999).

2.6.2.3. El fosfato trisódico (TSP).

El fosfato trisódico se ha utilizado para la descontaminación de las canales de aves de corral y puede reducir los contaminantes bacterianos en el ganado vacuno contaminada con *L. monocytogenes* eliminando 1.3 log de las células, pero después de siete días de almacenamiento en frío, el resto de las bacterias comenzaron a crecer (Ellin, 1999). No se conoce su mecanismo exacto de acción aunque probablemente se deba a su acción detergente y a lisis de las células bacterianas. Se han probado concentraciones de 8% y 12% a tiempos de inmersión de 15 segundos, sin alterar las características organolépticas de las canales tratadas (Moreno, 2006).

2.6.2.4. Extractos Vegetales.

Una variedad de hierbas y especias han sido probados por su eficacia en suprimir el crecimiento de *L. monocytogenes* en los medios de cultivo. Estos incluyen: extractos de lúpulo, eugenol, pimienta morrón hoja, rábano picante destilados, el romero, clavo de olor, ácido cinámico, furanocumarinas y carvacol. Cabe señalar que *L. monocytogenes* ha sido menos sensible a estos extractos en carne (en comparación con medios de cultivo) y la sensibilidad varía con el contenido de grasa en la carne (Larson *et al.*, 1996).

2.6.2.5. Quelantes (citrato y EDTA)

Los quelantes, que se unen a iones metálicos, no son por sí mismos letal para *L. monocytogenes*, en las concentraciones utilizadas en los alimentos. Sin embargo, estos compuestos interactúan con otros conservantes y a veces ayudan a suprimir el crecimiento de *L. monocytogenes* en carnes. En otros casos, sucede lo contrario; por ejemplo en la asociación EDTA-nisina, donde el EDTA reduce los efectos antimicrobianos de nisina (Zhang, 1999).

2.6.2.6. Lisozima.

Suprime el crecimiento de *L. monocytogenes* en embutidos de cerdo fresco (salchicha) durante 2-3 semanas (Hughey *et al.*, 1989)

2.6.2.7. Sorbato (ácido sórbico).

Los experimentos utilizando medios de cultivo revelaron que *L. monocytogenes* fue más susceptible cuando se utilizó sorbato a un pH más bajo (pH 5 vs pH 6) y a temperaturas más bajas (5°C vs 30°C) (Ellin, 1999).

2.6.2.8. Bacteriocinas

Puede aplicarse de dos formas: añadiendo la bacteriocina directamente a los alimentos en una forma purificada o parcialmente purificada o adicionar las bacterias productoras de bacteriocinas a la carne para que crezcan y produzcan bacteriocinas *in situ* (Ellin, 1999).

Entre las bacteriocinas empleadas tenemos: Nisina, se utiliza actualmente para la preservación de algunos alimentos debido a su estado de GRAS y efectos antilisteriales conocidos; Pediocin AcH, en carne molida de cerdo, esta bacteriocina redujo *L. monocytogenes* en 24 horas pero pierde su efectividad con el tiempo porque se degrada por acción de las proteasas de la carne; Sakacin, parece ser útil para cultivos iniciadores como la salchicha por acción de las condiciones de temperatura y de pH presentes durante la fermentación de embutidos secos; Lactocin 705 producido por *Lactobacillus casei*, que ejerce un efecto inhibitor moderado sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en carne de vacuno picada; y el Reuterin, producida por *Lactobacillus reuteri* es un agente antimicrobiano de amplio espectro soluble en agua, eficaz en un amplio rango de pH y resistente a las enzimas proteolíticas y lipolíticas. Cuando se añade a la superficie de la carne reduce las poblaciones de *L. monocytogenes* en 0.3 y 3.0 log. El ácido láctico ayuda a aumentar la eficacia de esta bacteriocina (Ellin, 1999).

2.6.2.9. Procesos térmicos

Estos tratamientos son muy eficaces en matar los agentes patógenos de los alimentos, pero las altas temperaturas o calentamiento prolongado pueden alterar las características

sensoriales de los alimentos (Moreno, 2006). Un estudio, trozos de lomo de carne de vacuno fueron sometidos durante 16 min a 85°C y se disminuyó la población de *L. monocytogenes* en hasta 4 unidades logarítmicas, sin embargo, algunas células sobrevivieron y estas podrían ser capaces de crecer en condiciones apropiadas (Ellin, 1999).

2.6.2.10. Radiación

L. monocytogenes es significativamente más resistente a la irradiación en la carne que en los medios de cultivo. A mayor concentración de *L. monocytogenes* en carne, es mayor la dosis de radiación. Además este patógeno puede sobrevivir en ambientes fríos y comenzar a multiplicarse si la carne irradiada se almacena en condiciones de refrigeración (Ellin, 1999).

Algunas dosis recomendadas de irradiación incluyen: (a) 3 kilogray (KGy) para la eliminación de 10^3 células de *L. monocytogenes* por gramo en el aire del ambiente donde se almacena pollo congelado, (b) 2,5 kGy para matar a *L. monocytogenes* por 10^4 g de carne picada y (c) 2 kGy para destruir 10^4 *L. monocytogenes* en carne de pollo deshuesada mecánicamente y almacenada a una temperatura entre 2-4 °C. (Ellin, 1999).

2.6.2.11. Alta presión

Alta presión hidrostática provoca grandes daños a células con efectos adversos en las membranas, enzimas y otras estructuras y las moléculas. *L. monocytogenes* es sensible a los tratamientos de alta presión de 400-500 MPa (Megapascal), pero como otros organismos Gram-positivos es una de las especies más resistentes de bacterias. Algunas variaciones en la sensibilidad a la presión son evidentes a temperaturas más bajas (25°C), pero desaparece en gran medida a 50 °C (Mackey *et al.*, 1994)

2.6.2.12. Luz ultravioleta (UV)

La UV no puede penetrar en los alimentos, por lo tanto sólo los microbios ubicados en la superficie expuesta son susceptibles a sus efectos. Las bacterias en una superficie lisa, absorben más luz ultravioleta que las bacterias sobre una superficie rugosa.

Los estudios han demostrado que la exposición UV no tiene un efecto perjudicial sobre el color de la carne ni da lugar a la rancidez oxidativa debido a que la luz UV no induce la

producción de radicales oxidante libre. Experimentos con *L. monocytogenes* demostraron que las células en un ambiente húmedo murieron más fácilmente que los de una película seca o corteza. Además, longitudes de onda cortas (254 nm) de la luz UV fueron más eficaces que las largas (365 nm).

Una comparación de la susceptibilidad de los patógenos transmitidos por los alimentos (cultivadas en placas de agar) reveló que la *L. monocytogenes* fue la más resistente a la luz ultravioleta: *L. monocytogenes* > *Staphylococcus aureus* > *Salmonella enteritidis* > *E. coli* > *Bacillus cereus*. La toxicidad de la luz UV se debe a la formación de dímeros de timina, que perturban la estructura y el funcionamiento del ADN en las células bacterianas (Ellin, 1999).

2.6.2.13. Ultrasonido

El ultrasonido afecta las membranas celulares, aparentemente como resultado de la formación e explosión posterior de pequeñas burbujas (cavitación). Actualmente, el ultrasonido se utiliza en el procesamiento de alimentos para emulsificar, acelerar la congelación y como método de limpieza. Debido a que los líquidos viscosos y los sólidos impiden la propagación de las ondas de ultrasonido, esta técnica es potencialmente más útil para esterilizar líquidos como la leche y los zumos (Ellin, 1999).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio:

Las muestras evaluadas fueron obtenidas del centro frigorífico La Colonial ubicado en la Provincia Constitucional del Callao en el departamento de Lima (Anexo 3). El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Salud Pública y Salud Ambiental de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2. Animales de estudio

Se emplearon canales de bovinos de diferentes zonas de producción las que luego de ser beneficiados fueron muestreadas para el estudio. Todos los animales fueron inspeccionados antes, durante y después del beneficio y aprobados para su comercialización durante la inspección veterinaria.

3.3. Materiales y equipos

3.3.1. Toma de muestras

- Guantes
- Mascarillas
- Hisopos de algodón estériles
- Marcos estériles de 10 cm x 10 cm
- Tubos de ensayo

- Medio de pre enriquecimiento BLEB (Caldo Buferado para Enriquecimiento de *L. monocytogenes*)
- Aspersores manuales
- Solución de ácido láctico al 2.5%
- Recipiente isotérmico (Cooler)

3.3.2. Laboratorio

- Autoclave
- Refrigeradora
- Estufas para Incubación
- Estufa de Baño María
- Balanza
- Pipeta unicanal
- Pipeta multicanal
- Mechero
- Tubos de ensayo
- Agar PALCAM
- Kit de diagnóstico para *L. monocytogenes* (GeneQuence)

3.4. Tamaño de muestra

Se calculó el tamaño de la muestra mediante la fórmula de diferencia de proporciones (WinEpi, 2006). Se usó una proporción referencial de 29.6% de canales contaminadas *con L. monocytogenes* obtenido en un estudio previo (Noé *et al.*, 2010 no publicado) esperando hallar una proporción mínima del 1% de canales contaminadas con este patógeno con un nivel de confianza del 95% para el error tipo 1 y un nivel de poder para el error tipo 2 del 90 %. El tamaño de la muestra calculado fue de 24 canales para cada grupo; para el presente estudio se evaluaron 29 canales por cada uno de los grupos.

3.5. Metodología

3.5.1. Lugares de muestreo

Las muestras evaluadas fueron tomadas de la superficie de las canales en 4 diferentes zonas como las establecidas por la Decisión de la Comunidad Europea (CE) N° 765 en el 2006 (Figura 7).

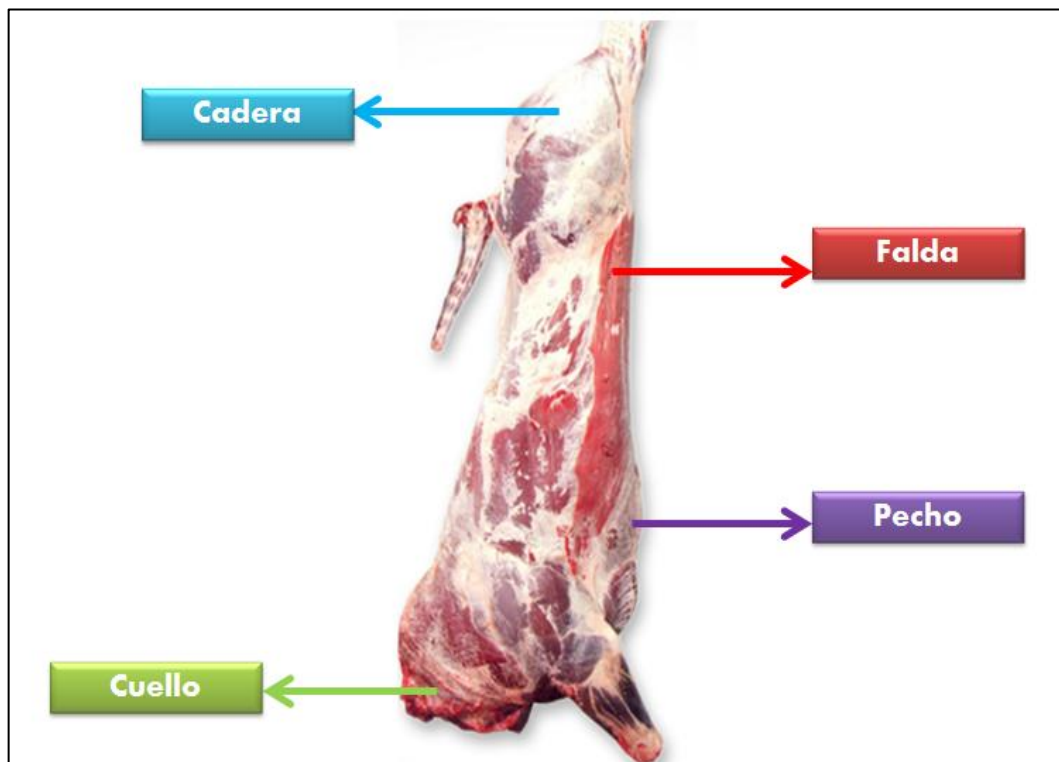


Figura 7. Zonas de muestreo

3.5.2. Tratamiento de las canales

Las canales evaluadas fueron divididas en dos grupos de forma aleatoria en la zona de oreo, siendo debidamente identificadas para su posterior ubicación. El primer grupo (Grupo 1) no contó con ningún tratamiento y fueron sometidas solo a refrigeración por 24 horas. De acuerdo a lo establecido por La Food Safety and Inspection Service (FSIS) y por la Unión Europea en su Reglamento N° 101 (2013), las soluciones de ácido láctico solo se aplicarán en las canales enteras, medias canales o cuartos de carne de ganado bovino doméstico a nivel de centros de beneficio únicamente por pulverización o nebulización usando una concentración de 2 al 5% en agua potable a temperaturas de hasta un máximo de 55°C. Teniendo en cuenta este esto; en el presente estudio se aplicó ácido láctico a una concentración del 2.5% sobre la superficie de medias canales bovinas pertenecientes al segundo grupo (Grupo 2) de evaluación; por el método de aspersión manual y luego fueron sometidas a refrigeración durante 24 horas.

3.5.3. Toma de muestra y procesamiento

Las muestras se obtuvieron por métodos no destructivos de acuerdo a lo establecido en la norma ISO 17604 (ISO, 2003), mediante el uso de hisopos estériles frotando sobre la superficie de las canales en direcciones horizontal y vertical por cada zona de muestreo. El muestreo total fue de un área de 400 cm² por canal (100 cm² de cadera, 100 cm² de falda, 100 cm² de pecho y 100 cm² de cuello), las cuales fueron delimitadas con el uso de marcos estériles de 10 cm x 10 cm (Decisión de la Comunidad Europea (CE) N° 765, 2006) (Figura 8).

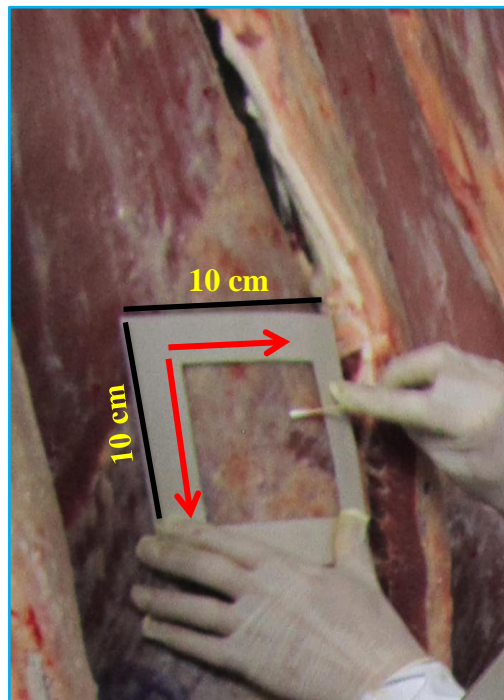


Figura 8. Método y área total de muestreo

Se realizaron dos muestreos por cada grupo. El primer muestreo para ambos grupos se realizó cuando las canales se encontraban en la sala de oreo y antes de que ingresaran a la sala de refrigeración. En el caso del segundo grupo, posterior al primer muestreo y antes de su ingreso a la sala de refrigeración se le aplicó el ácido láctico al 2.5% sobre la superficie de la canal. El segundo muestreo se realizó 24 horas después y en la cámara de refrigeración para ambos grupos.

Los hisopos correspondientes a cada canal (4 por cada canal, una de cada zona) fueron sumergidas en tubos de ensayo que contenían un medio de pre enriquecimiento (BLEB) (Figura 9), los cuales fueron preparados 24 horas antes del muestreo y almacenadas en refrigeración, para luego ser transportadas al laboratorio en condiciones de refrigeración usando un cooler con ice pack para iniciar el procesamiento tal como se muestra en la Figura 10.

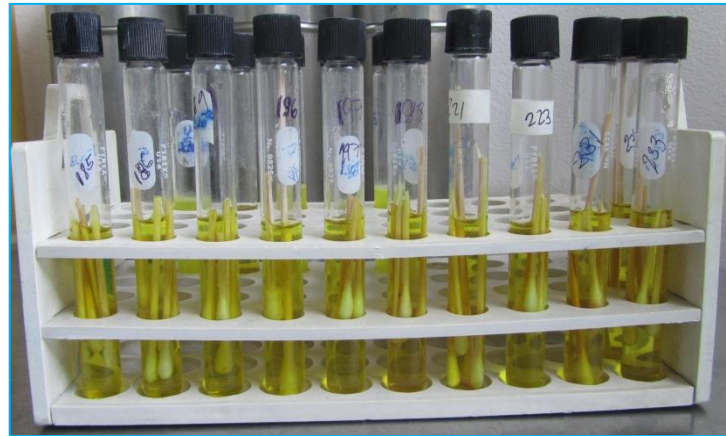


Figura 9. Medio BLEB con 4 hisopos de cada canal evaluada

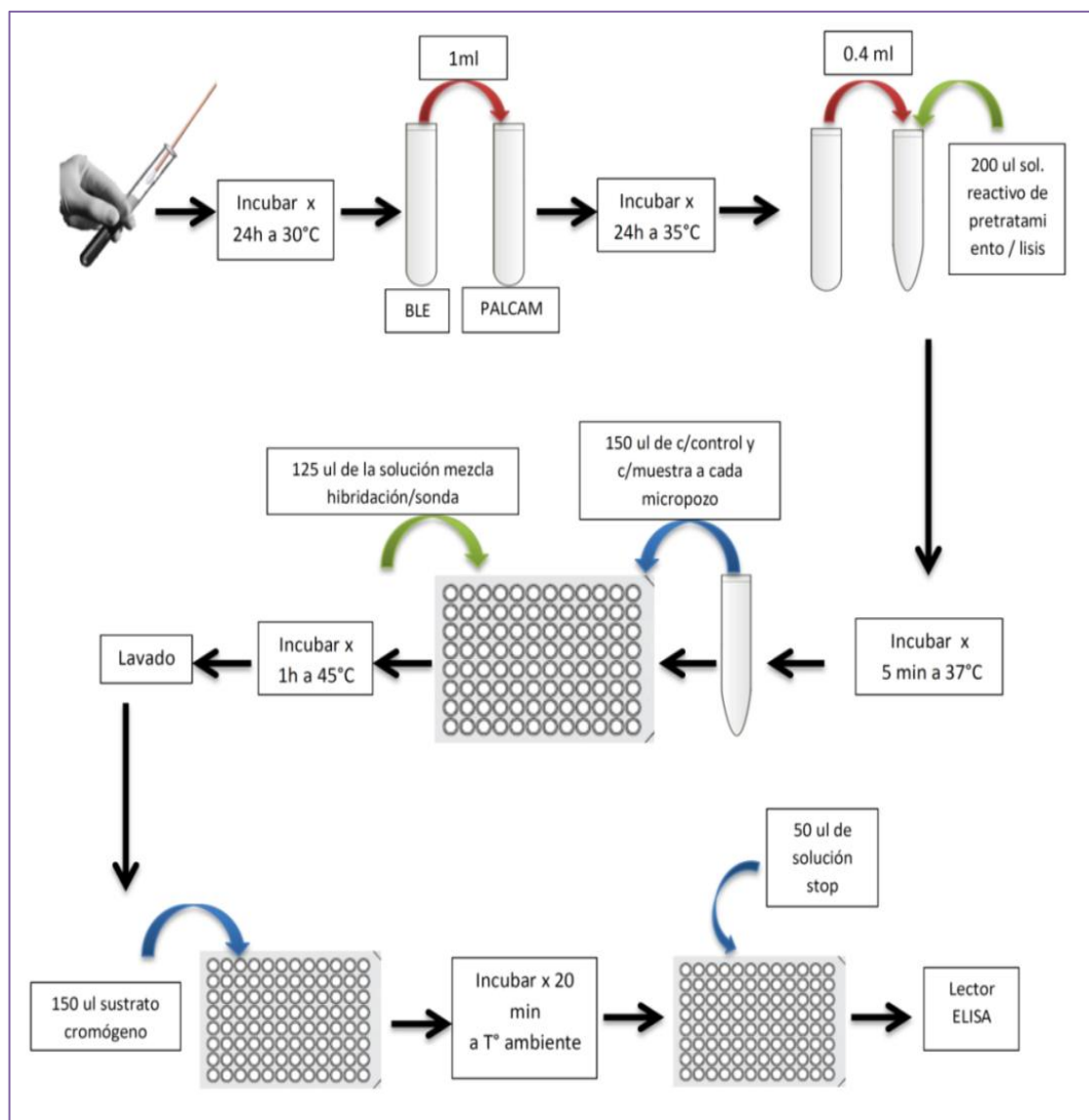


Figura 10. Esquema del procedimiento empleado para detección de *L. monocytogenes*

En el laboratorio las muestras obtenidas fueron colocadas en estufa por un periodo de 24 horas a 30°C (Figura 11).



Figura 11. Incubación a 30°C de las muestras durante 24 horas en BLEB.

Pasado este tiempo se transfirió 1 ml del cultivo al medio de enriquecimiento PALCAM, el cual fue preparado 24 horas antes y se mantuvo en refrigeración, llevándose a estufa a 35°C por 24 horas (Figura 12).



Figura 12. Incubación a 30°C por 24 horas en medio PALCAM

Para el procesamiento final se usó un Kit de diagnóstico para *L. monocytogenes* (Anexo 4) el cual emplea sondas de ADN, que permitirán la detección rápida y exacta de la presencia de *Listeria monocytogenes* en las canales bovinas; el proceso se inició identificando los viales con

la designación control positivo, negativo y número de muestra, luego se colocaron los micropozos en la placa porta pozos en la que el primer pozo fue designado para el control negativo, el segundo para el control positivo y luego un pozo para cada muestra a ser evaluada.

Luego se extrajo 0.4 ml del sobrenadante del medio PALCAM de cada muestra y se colocó en viales respectivos (Figura 13); se preparó el reactivo de pre tratamiento (frasco 1B en 1A) y lisis (frasco 2B en 2A) para luego adicionar 200 ul de la solución final (1A+2A) e incubar a 37°C por 5 minutos (Figura 14) esto permite la liberación del material genético de la bacteria.

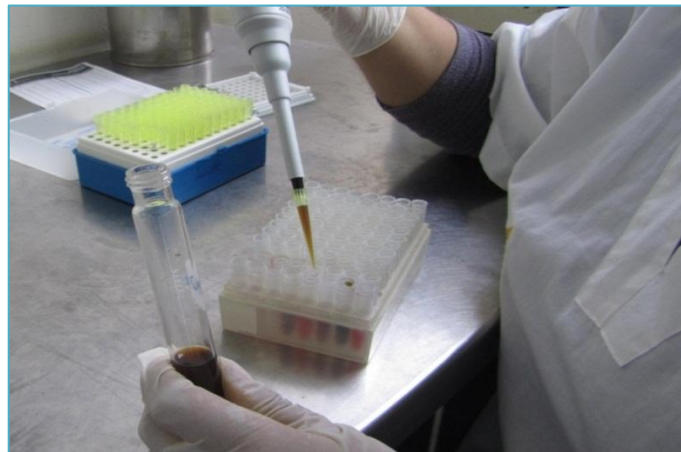


Figura 13. Transferencia del sobrenadante del medio PALCAM



Figura 14. Adición de solución de pre tratamiento y lisis.

Luego de ello se transfirió 150 μ l de cada control y de cada muestra a los micropozos respectivos (Figura 15), donde se adicionó 125 μ l de la solución mezcla hibridación/sonda, esta solución se obtiene al combinar la solución de hibridación con la solución de sonda que corresponde a los frascos 3 y 4 respectivamente, de acuerdo a lo establecido en la tabla que está incluida en el kit. Luego se dejó incubar por 1 hora a 45°C (Figura 16).

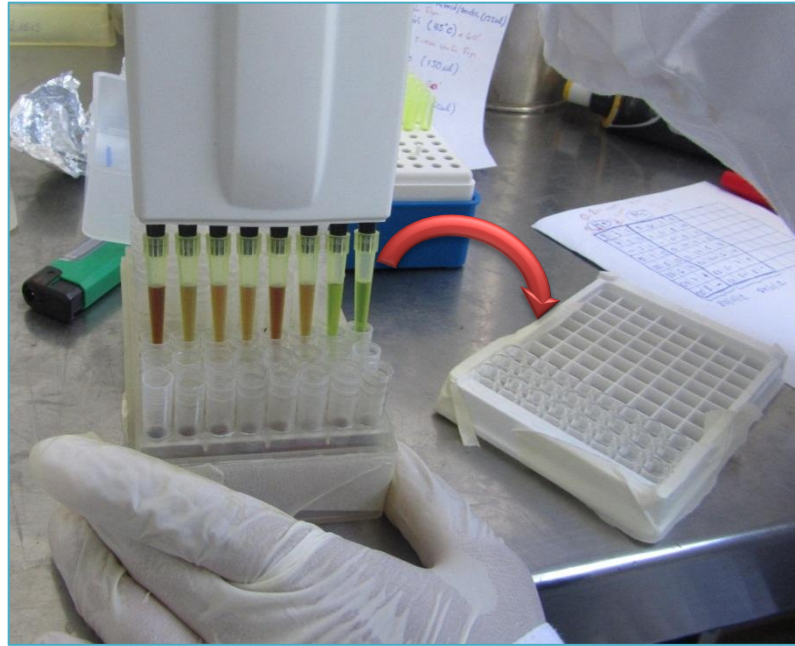


Figura 15. Transferencia de controles y muestras a los micropozos identificados



Figura 16. Adición de solución mezcla Hibridación/sonda

Se procedió luego a realizar el lavado de los micropozos empleando la solución de lavado, esta solución se prepara mezclando 25 ml de solución de lavado concentrado (frasco 5) en 950 ml de agua destilada, la cual debe tener un pH neutro (Figura 17). A continuación se adicionó 150 μ l de la solución sustrato cromógeno (frasco 6) a todos los micropozos y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente (Figura 18).

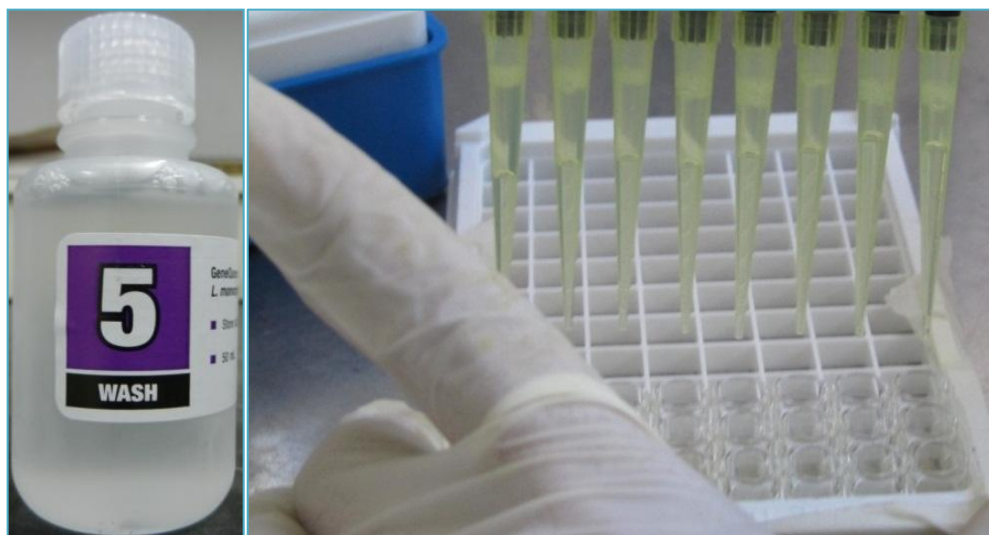


Figura 17. Lavado de micropozos (5 veces)

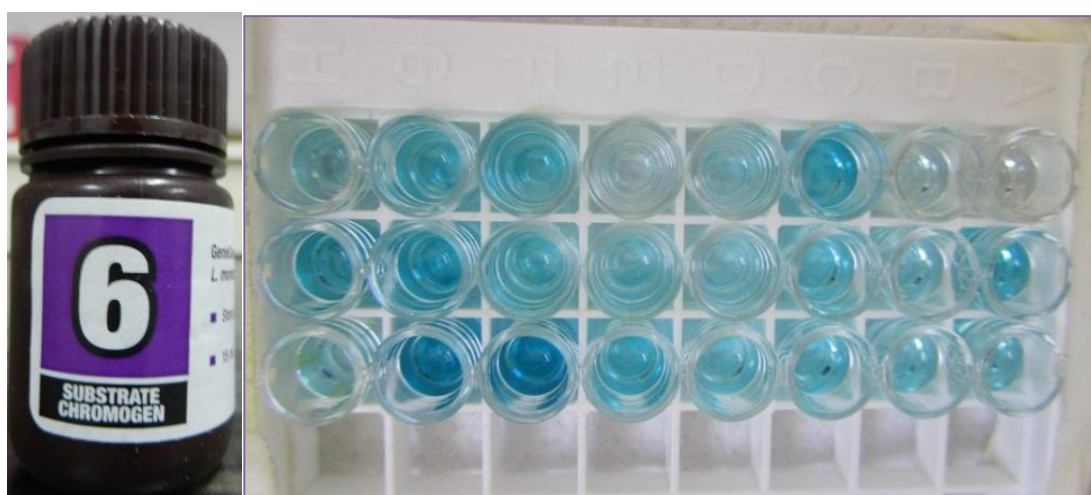
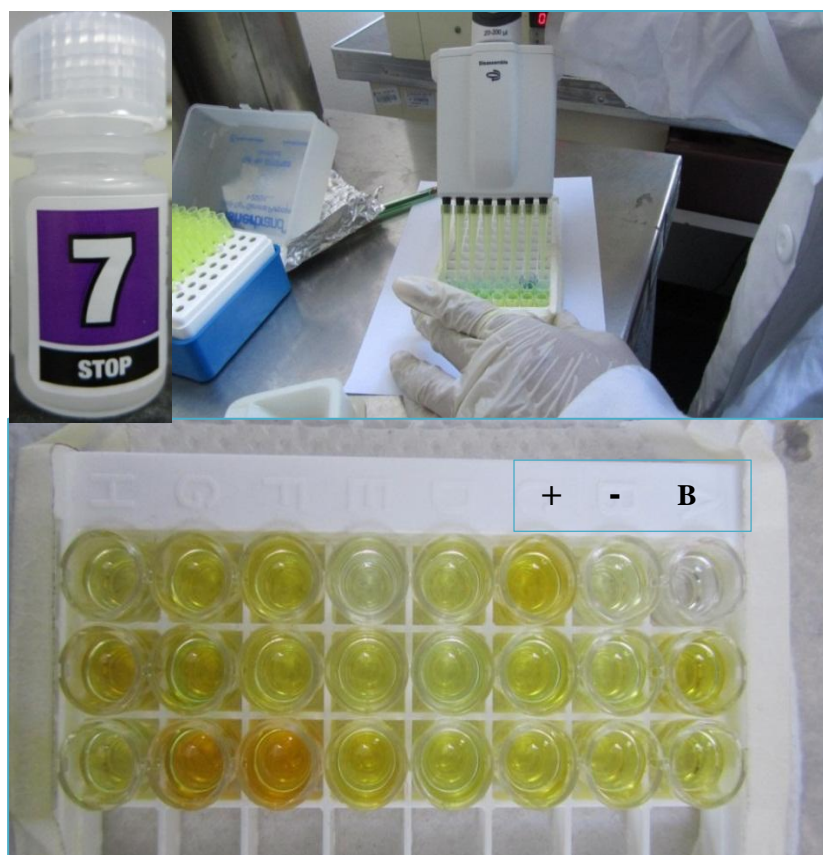


Figura 18. Coloración adquirida luego de la colocación del sustrato cromógeno

Finalmente se agregó 50 ul de solución stop (frasco 7) a cada micropozo y se leyó la reacción a través del Lector ELISA a 450 nn (Figura 19 y 20).



(+): Positivo (-): Negativo (B): Blanco

Figura 19. Adición de la solución stop y cambios en coloración



Figura 20. Lector ELISA

De acuerdo a las indicaciones incluidas en el kit de diagnóstico las muestras que producen valores de absorbancia menor de 0.10 serán negativas respecto de la presencia de *L. monocytogenes* mientras que aquellas muestras que producen valores de absorbancia mayor de 0.10 serán positivas respecto de presencia de *L. monocytogenes*.

3.6. Cálculo de resultados

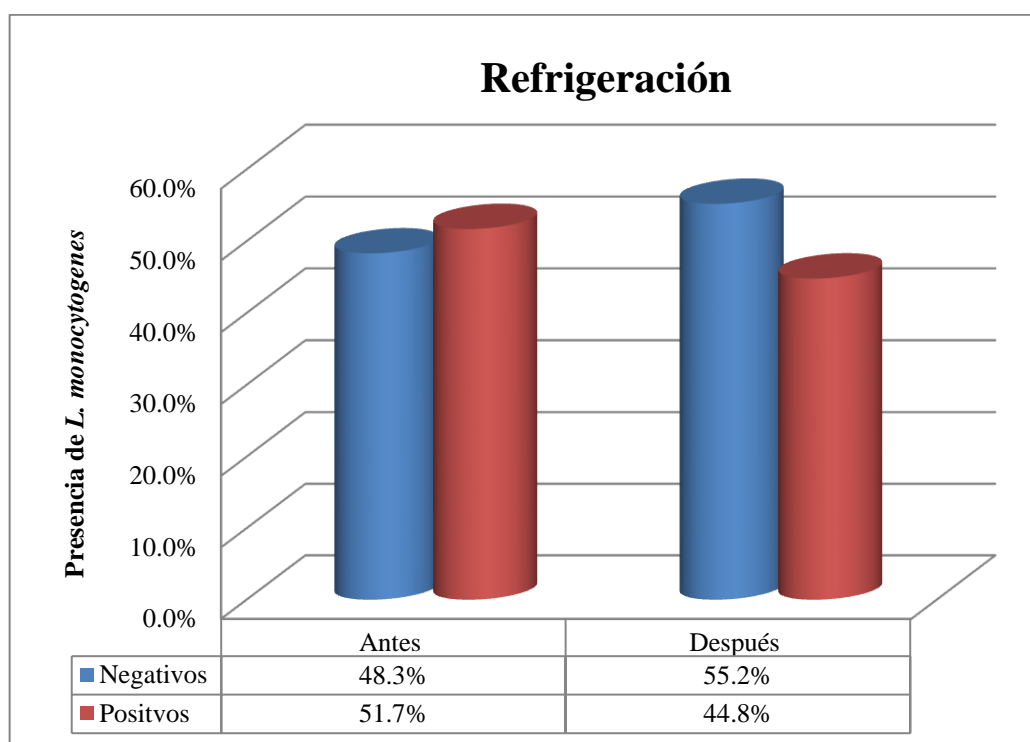
3.6.1. Análisis de la información

Para poder determinar si el ácido láctico induce cambios significativos sobre la presencia de *L. monocytogenes* en canales bovinas evaluadas antes y después de 24 horas de la refrigeración y poder determinar si el tratamiento es el indicado, se empleó la prueba estadística de McNemar que evalúa las variaciones de una variable antes y después de una determinada circunstancia (Álvarez, 2007).

IV. RESULTADOS

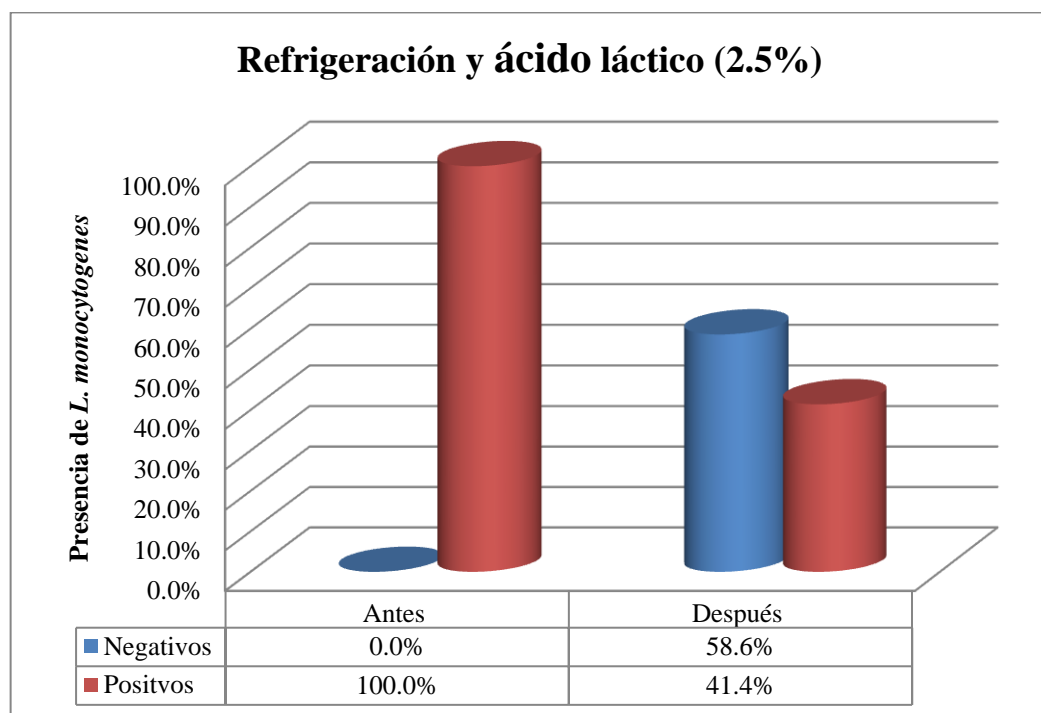
De acuerdo a los valores de absorbancia obtenidos en la evaluación de cada una de las muestras de ambos grupos se obtuvieron canales contaminadas con *L. monocytogenes* y otras libres del patógeno (ver Anexos 6 y 7). Así tenemos que para el grupo 1 (sometido a refrigeración) se encontraron un total de 15 (51.7%) canales contaminadas por *L. monocytogenes* y después de 24 horas de refrigeración se encontró un total de 13 (44.8%) canales contaminadas con *L. monocytogenes* (Gráfico 1).

Gráfico 1. Canales positivas y negativas a la presencia de *L. monocytogenes* antes y después de la de refrigeración (Grupo 1)



En el grupo 2 (sometido a refrigeración y al tratamiento con ácido láctico) el 100% de canales evaluadas presentaron contaminación con *L. monocytogenes* antes de ser sometidas al tratamiento y a la refrigeración; después aplicar el ácido láctico al 2.5% y luego de un periodo de refrigeración de 24 horas se encontró que la superficie de 12 (41.4%) canales estaban contaminadas *L. monocytogenes* (Gráfico 2).

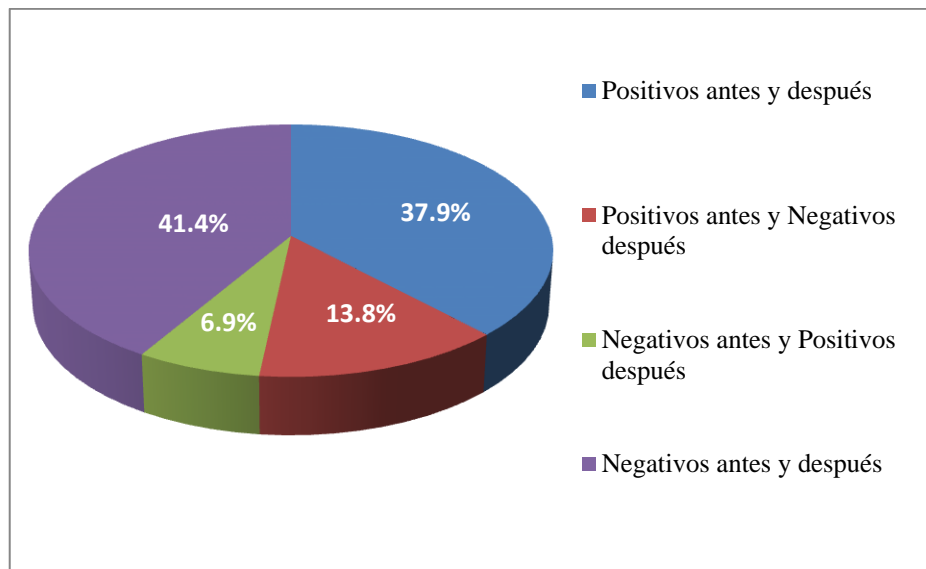
Gráfico 2. Canales positivas y negativas a la presencia de *L. monocytogenes* antes y después de la refrigeración y del tratamiento con ácido láctico (Grupo 2)



Sin embargo hubo cambios con respecto a la presencia de la bacteria sobre la superficie de las canales al ser sometidas únicamente a refrigeración para el grupo 1 y a la acción conjunta de ácido láctico y refrigeración para el grupo 2.

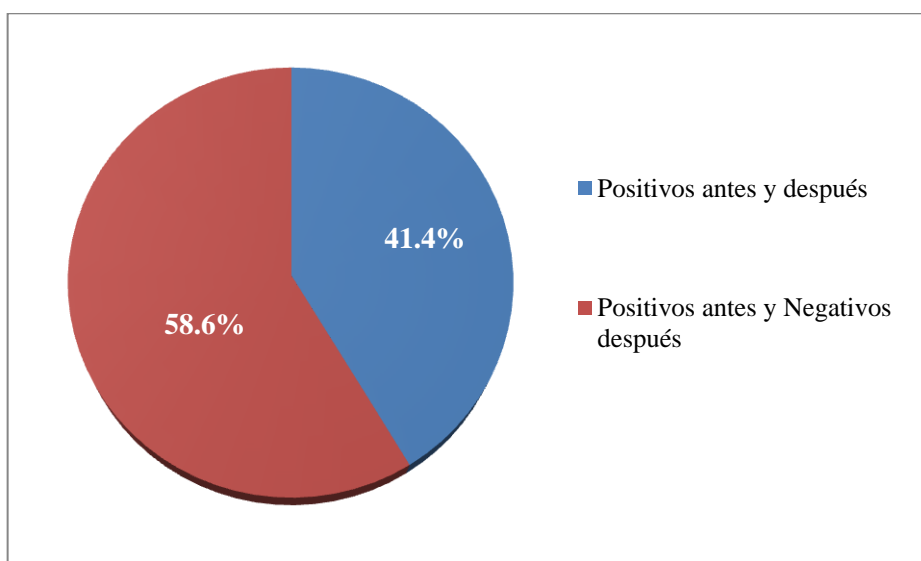
En el Gráfico 3 se puede observar la distribución de las canales contaminadas antes y después de la refrigeración sin tratamiento de ácido láctico. Así tenemos que el 41.4% de canales no estuvieron contaminadas con *L. monocytogenes* antes ni después de la refrigeración, el 37.9% de canales estuvieron contaminadas con el patógeno antes y después de la refrigeración, el 13.8% estuvieron contaminadas antes de la refrigeración pero luego de este proceso resultaron ser negativas a la presencia de *L. monocytogenes* sobre su superficie. Finalmente el 6.9% de las canales que inicialmente fueron negativas luego de la refrigeración resultaron contaminadas con *L. monocytogenes*.

Gráfico 3. Cambios en porcentaje de canales con respecto a la presencia de *L. monocytogenes* antes y después de la refrigeración (Grupo 1)



En el grupo 2 el 41.4% de las canales estuvieron contaminadas con *L. monocytogenes* antes y después del tratamiento, el 58.6% inicialmente estuvieron contaminadas con el patógeno pero luego de ser sometidas a la acción del ácido láctico (2.5%) y a la refrigeración por 24 horas resultaron negativas a la presencia de *L. monocytogenes* (Gráfico 4)

Gráfico 4. Cambios en porcentaje de canales con respecto a la presencia de *L. monocytogenes* antes y después de la refrigeración y del tratamiento con ácido láctico (Grupo 2)



En la evaluación estadística mediante la Prueba de McNemar para el grupo 1 (Cuadro 14) y grupo 2 (Cuadro 15), se obtuvo un valor de X^2_{MN} para el grupo 1 de 0.67 y para el grupo 2 este valor fue 17.

Cuadro 14. Número de canales positivas y negativas a *L. monocytogenes* antes y después de la refrigeración (Grupo 1)

		Después		Total
		Negativos	Positivos	
Antes	Negativos	12	2	14
	Positivos	4	11	15
	Total	16	13	29

Cuadro 15. Número de canales positivas y negativas a *L. monocytogenes* antes y después de la refrigeración y del tratamiento con ácido láctico (Grupo 2)

		Después		Total
		Negativos	Positivos	
Antes	Negativos	0	0	0
	Positivos	17	12	29
	Total	17	12	29

Comparando estos valores con la tabla de la distribución Chi-cuadrado (Anexo 5) cuyo valor es 3.84 con un grado de libertad (g.l.) =1; entonces podemos afirmar que el nivel de significancia (p) para el grupo 1 es mayor a 0.05 ($p > 0.05$) por lo tanto no existe diferencia estadística significativa que demuestre que la refrigeración pueda controlar la presencia de *L. monocytogenes* en canales bovinas. Para el grupo 2 el nivel de significancia es menor a 0.05 ($p < 0.05$) por lo tanto existe diferencia estadística significativa que demuestra la acción bactericida del ácido láctico al 2.5% contra de *L. monocytogenes* presentes en la superficie de las canales.

V. DISCUSIÓN

Desde el punto de vista nutricional la carne es una fuente habitual de proteínas, grasas y minerales en la dieta humana. De todos los alimentos que se obtienen la carne es el que mayores valoraciones y apreciaciones alcanza en los mercados.

Debido a su composición la carne es un medio adecuado para la proliferación de bacterias; a esto le debemos sumar que la industria cárnica se caracteriza por falta de higiene en el manejo de las canales durante el proceso de beneficio (Ojeda y Vásquez, 2009). Dentro de las bacterias que pueden estar presentes en la carne tenemos a *L. monocytogenes* la cual es la responsable de la listeriosis; enfermedad de origen alimentario (ETA) de carácter grave pero de baja frecuencia que ocasiona la muerte de hasta un 30% de los casos (Moreno, 2006).

En el presente estudio se demuestra que *L. monocytogenes* es un patógeno que se puede encontrar en la superficie de las canales esto coincide con lo encontrado en diferentes estudios. Así tenemos, que Gallego *et al.* (2005) en Colombia encontraron *L. monocytogenes* en el 2.26% de las canales evaluadas. Asimismo, Villamil (2005) en Colombia, encontró que el 8% de canales de bovinos de raza cebú tenían esta bacteria. Akkaya *et al.* (2008) en Turquía encuentran que un 6.8% de las canales evaluadas en un centro de beneficio estaban contaminadas con este patógeno. Wiczorek *et al.* (2012) en Polonia encuentran que el 2.5% de canales de bovinos estaban contaminadas con este patógeno. En Perú, Noé *et al.*, (2010, sin publicar) encontraron que la superficie del 29.6% de canales estuvieron contaminadas con *L. monocytogenes*.

En el Perú, la norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para alimentos y bebidas de consumo humano (NTS N° 071, 2008) no contempla *L. monocytogenes* dentro de las bacterias a considerar durante la inspección de carnes crudas, refrigeradas o congeladas (Anexo 8). Pero considerando lo establecido para otros

alimentos como quesos (Anexo 9), embutidos (Anexo 10), frutas y hortalizas (Anexo 11) y lo establecido para alimentos listo para el consumo (LPC) en el Codex Alimentarius (CAC/GL 61. 2007) (Anexo 12 y 13) así como lo establecido en el Reglamento C.E. N° 1441 (2007) (Anexo 14) para carnes picadas, donde esta bacteria tiene tolerancia cero es decir debe estar ausente, podemos concluir que las canales en las que se encontró esta bacteria no cumplen con lo estipulado en los reglamentos anteriormente señalados.

La contaminación de estas canales con *L. monocytogenes* puede tener su origen en el suelo, agua fresca, heces de los animales e incluso la contaminación se puede producir durante el beneficio ya que esta bacteria es altamente ubicua de acuerdo a Alle y Konemam (2008). La contaminación cruzada entre la carne y los equipos o utensilios de la playa de faena permiten que este microorganismo permanezca en la superficie de las canales (Gallego *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2008). Estudios como el de Tipán (2012) que evalúa la presencia de *L. monocytogenes* en tres etapas del beneficio de bovinos encontró que los valores más altos de Listeria se presentan en el siguiente orden: etapa del eviscerado, división de las canales y finalmente desollado; lo que coincide con lo señalado por Elmali *et al.* (2012) quien menciona que las fallas en el manejo de los puntos críticos de control como: la higiene de los equipos usados durante el beneficio, la deficiente higiene del personal y los malos procedimientos durante la faena afectan la calidad de la carne y favorecen su contaminación. Todo esto puede explicar la presencia de *L. monocytogenes* en la superficie de las canales evaluadas en este estudio.

Dentro de los métodos para conservar la carne, la refrigeración es el más usado. Así tenemos que Adams y Moss (2008) recomiendan el uso de la refrigeración para controlar la proliferación de la flora bacteriana que se encuentra normalmente en la superficie de las canales, de esta manera se busca alargar la vida útil del producto. La mayoría de bacterias que se encuentran en la canal no soportan temperaturas bajas y pueden ser inhibidas mediante este proceso. Pero existe un pequeño grupo de bacterias denominadas psicrófilas, que pueden vivir a temperatura de refrigeración; dentro de estas bacterias se encuentra *L. monocytogenes* (Amerling, 2001).

En el primer grupo de experimentación se encontró que el 37.9% de canales evaluadas antes de la refrigeración estuvieron contaminadas con *L. monocytogenes*, luego de ser sometidas a refrigeración por 24 horas estas canales siguieron siendo positivas a *L. monocytogenes*, lo que demuestra la capacidad de esta bacteria para soportar bajas temperaturas. Esto concuerda con el estudio realizado por Walker *et al.* (1990) quienes evaluaron el crecimiento de *L. monocytogenes* a temperaturas de refrigeración, encontrando que a 5°C había crecimiento de esta bacteria y que a 0°C este crecimiento era mucho más lento pero se inhibía. Lo encontrado

en este trabajo también se asemeja con lo hallado por Figueroa *et al.* (2005) quienes observaron crecimiento de *L. monocytogenes* en preparados de atún almacenados a 6°C.

En el estudio se encontró que el 13.8% de las canales; que fueron inicialmente positivas a *L. monocytogenes*; luego de 24 horas de refrigeración resultaron negativas a la presencia de la bacteria. Esto probablemente se deba al descenso del pH muscular pos mortem producido por la producción anaerobia de ácido láctico que ocasiona que disminuya el pH y la Actividad de agua (Amerling, 2001). El descenso en la *A_w* ocasiona la desecación superficial de la carne repercutiendo positivamente en la eliminación de algunas bacterias. Esto coincide con lo mencionado por Adams y Moss (2008) quienes indican que a bajas temperaturas hay crecimiento de bacterias psicrófilas, las que pueden ser inhibidas por el secado parcial de la superficie de las canales. Asimismo, la elevada velocidad de aire dentro de la cámara de refrigeración puede contribuir a la desecación superficial de las canales contribuyendo esto a la eliminación de las bacterias de la superficie (Moreno, 2006)

Probablemente esto también esté relacionado con la carga bacteriana inicial considerando que una carga bacteriana baja puede ser reducida o eliminada con un pH bajo como lo señalado por Dickson en el año 1992, él concluye que la reducción microbiana producida por la aplicación de ácidos orgánicos es proporcional a la carga microbiana inicial. Se debe considerar también la probable presencia de bacterias ácido lácticas (BAL) las cuales tienen efectos inhibidores sobre *L. monocytogenes* debido a la producción de ácido láctico y bacteriocinas (Ellin, 1999). Así tenemos que Flores *et al.* (2011) y Mateauda (2013) encontraron BAL en muestras de carne de res en valores de 3.24 log UFC/g y 2.04 log UFC/g respectivamente en ambos casos estos valores se incrementaron con el tiempo de refrigeración y empaclado al vacío. Esto podría explicar también el hecho de que el 41.4% de las canales que fueron negativas antes de la refrigeración, si sufrieron contaminación en algún momento durante su almacenamiento hayan sido negativas a la presencia de *L. monocytogenes* después de la refrigeración.

El 6.9% de canales que fueron negativas a *L. monocytogenes* al inicio, luego de ser refrigeradas fueron evaluadas resultando positivas a esta bacteria. Esto podría tener relación con la higiene del personal encargado de transportar las canales de la sala de oreo a la sala de refrigeración. Elmali *et al.* (2012) indican que uno de los orígenes de la contaminación con *Listeria* en la carne se debe a la falta de higiene del personal. Murray *et al.* (2006) indican que existen personas portadoras de *L. monocytogenes* que eliminan constantemente este patógeno en las heces, ellos representan entre el 1% y 5% de los individuos sanos. Se debe mencionar que durante la toma de muestra, se pudo observar a personas ajenas al centro de beneficio que

entraban en contacto con algunas canales en la zona de oreo y refrigeración. Asimismo, un estudio realizado paralelamente en el mismo centro de beneficio determinó la presencia de *L. monocytogenes* en el personal que labora en la sala de oreo (Quispicondor, 2012 sin publicar). Jeong y Frank (1994) realizaron la evaluación de la presencia de *L. monocytogenes* en un matadero concluyendo que esta bacteria puede ingresar a través de la vestimenta, el calzado y las manos de los operarios

Otra fuente de contaminación puede ser el contacto entre las canales; de acuerdo con el D.S. N° 015-2012-AG, no debe existir contacto de las canales con el piso, las paredes ni entre ellas. Un estudio realizado por McEvoy *et al.* (2003) demostraron que existe contaminación cruzada entre canales; al evaluar el contacto que tuvieron dos canales una positiva y otra negativa a *E. coli* O157:H7 durante la refrigeración encontraron que las zonas de las canales libres de la bacteria antes del ingreso a la sala de refrigeración terminaron contaminadas luego de esta. Otra posible fuente de contaminación puede ser el cuarto de refrigeración donde se almacenan las canales, esto debido a que *L. monocytogenes* tiene la capacidad de formar biopelículas sobre las superficies, en refrigeración necesita de 20 minutos a cuatro horas y entre 4 y 20°C para formarse (AESAN, 2010); las biopelículas pueden estar en los pisos o paredes, pudiendo producir la contaminación si la canal entra en contacto con ellas, considerando que el tiempo necesario para que se produzca la adhesión de las bacterias es de solo 5 a 30 segundos. Así tenemos que un estudio realizado en Brasil por Coruja en el año 2012; para determinar la presencia de *L. monocytogenes* en las cámaras de refrigeración; encontró que el 12.5% de muestras tomadas del piso de la cámara y el 25% de los ganchos que sostienen las canales estaban contaminadas con *L. monocytogenes*, lo que demuestra la supervivencia y proliferación de este patógeno en ambientes refrigerados.

El uso de ácidos orgánicos como descontaminante se ha usado en diferentes estudios; para canales bovinas se recomienda que la aplicación se realice antes del enfriamiento y con soluciones de ácido láctico entre 1% a 2% (Moreno, 2006) sin embargo según lo establecido en el Reglamento de la Unión Europea N° 101 (2013) el ácido láctico puede emplearse a una concentración entre el 2% al 5% pero a temperaturas que no excedan los 55°C. En general, el tratamiento con soluciones de ácido láctico al 2% aplicado a una temperatura de 37 °C sobre la superficie de la carne se ha descrito como óptimo (James, 2002).

En el estudio el 58.6% de canales positivas a *L. monocytogenes* antes del tratamiento con ácido láctico al 2.5% y refrigeración resultaron negativas a la presencia de esta bacteria luego de 24 horas. Esto demuestra la acción bactericida de la sustancia aunque no es eficaz en un 100%. Diversos estudios en los que se ha empleado el ácido láctico a una concentración

similar a la empleada en este estudio no reportan una acción bactericida total pero si reducciones en la carga bacteriana.

Así tenemos, que El-Khateib *et al.* (1993) compararon los efectos antimicrobianos del ácido láctico al 2%, la nisina (4×10^4 UI/ml) y pediocina (3.2×10^3 unidades arbitrarias/ml), ellos emplearon trozos cúbicos de carne los cuales fueron sumergidos en una suspensión de *L. monocytogenes* por un minuto, luego fueron almacenadas en refrigeración a 4°C por 48 horas. En el estudio se obtuvo una disminución en el recuento de la bacteria de 1.7, 1.1 y 0.6 log UFC/6cm² para el ácido láctico al 2%, nisina y pediocina respectivamente; concluyendo que el ácido láctico tiene efecto residual y una acción bactericida mayor en comparación con nisina y pediocina que tuvieron un efecto inhibitorio inmediato pero ningún efecto residual. Castillo *et al.* (1998) demostraron también la acción bactericida del ácido láctico al 2%, el cual fue aplicado a las canales mediante pulverización, obteniendo una reducción mayor entre 4.6 a 4.9 log UFC/cm² el número de microorganismos presentes en las superficies de las canales.

Ozdemir *et al.* (2006) inoculan muestras de tejido muscular con *L. monocytogenes* y las sumergen en soluciones de ácido láctico al 1% y 2% durante 15 segundos luego estas fueron almacenadas a 4°C; obteniendo reducciones de 1.12, 1.14, y 2.16 log UFC/g para el grupo tratado con ácido láctico al 1% y de 1.70, 1.59 y 2.54 log UFC/g en el grupo tratado con ácido láctico al 2% reportados en la primer, tercer y quinto día, respectivamente, donde también se demostró que hubo una mayor inhibición con el empleo de ácido láctico al 2%. Estos resultados fueron similares a los hallados por Elmali *et al.* (2012) quienes compararon los efectos inhibitorios del ácido láctico al 1% y 2% y ácido acético al 2%; para ello emplearon muestras del lomo (*músculo longissimus dorsi*) dividida en pequeños trozos, los cuales fueron inoculados con 10^8 UFC /ml de *L. monocytogenes* mediante inmersión durante cinco minutos y luego almacenadas a 4°C por 35 minutos para la fijación bacteriana, luego fueron sumergidas en cada tratamiento por 15 segundos a temperatura ambiente y almacenadas luego en refrigeración, obteniendo que el nivel más alto de inhibición bacteriana fue en las muestras de carne tratada con ácido láctico al 2% con reducciones de 0.8, 1.6 y 1.16 log UFC/g en el primer, tercer y quinto día respectivamente en comparación con las reducciones obtenidas por ácido láctico al 1% (0.01, 1.24 y 0.27 log UFC/g) y para el ácido acético al 2% (se observó un ligero incremento de 0.46, 0.01 y 0.15 log UFC/g) el primer, tercer y quinto día respectivamente.

Carpenter *et al.* (2011) demostraron también que el ácido láctico al 2% es más efectivo para reducir los niveles de *L. monocytogenes* al compararlos con el ácido acético y ácido levulínico a la misma concentración. Para ello emplearon pechugas de pavo molida y mezcladas con agua, tripolifosfato de sodio, sal, dextrosa, azúcar y carragenina; fueron embutidas y

cocidas por 2 horas a 54°C y almacenadas a 4°C por una noche para finalmente ser cortados en trozos pequeños. Cada trozo de pavo fue inoculado con 10^7 UFC/cm² de *L. monocytogenes* y se frotan suavemente entre ellas para distribuir el inóculo; se dejaron secar a temperatura ambiente por 20 minutos y luego se aplicaron los ácidos mediante pulverización por 20 segundos a 55.4°C; se dejaron secar al ambiente por 20 minutos, se empacaron al vacío y se refrigeraron por 24 horas a 4°C. Obteniendo finalmente durante el conteo 6.26, 5.56 y 5.86 UFC/cm² para ácido acético al 2%, ácido láctico al 2% y ácido levulinico al 2% respectivamente.

Ariyapitipun *et al.* (2000) emplearon ácido láctico al 2%, ácido polilactico al 2% y nisina (400 UI/ml) para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*, inicialmente inoculadas con 5.33 log UFC/cm², estas soluciones se aplicaron sumergiendo los trozos de carne durante cinco minutos y luego fueron secadas por goteo durante 15 minutos. Inicialmente hubo una reducción de 1.56 log UFC/cm² para el ácido láctico al 2%, 1.22 UFC/cm² para el ácido polilactico y 1.64 UFC/cm² para nisina. Y en las combinaciones de ácido polilactico al 2% con nisina se obtuvo una reducción de 1.57 UFC/cm² y para la combinación de ácido láctico al 2% con nisina se obtuvo una reducción de 1.94 UFC/cm². Pero luego de ser envasadas al vacío durante 42 días y almacenadas a 4°C el número de *L. monocytogenes* que quedaron viables en estas muestras fueron de 1.21 UFC/cm² para ácido polilactico, 0.36 UFC/cm² para ácido láctico, 2.21 UFC/cm² para ácido polilactico y nisina; 0.84 UFC/cm² para ácido láctico y nisina y 0.89 UFC/cm² para nisina; concluyendo también que el ácido láctico al 2% es más efectivo.

Conner *et al.* (1997) utilizaron concentraciones mayores de ácido láctico; para ello inocularon 3 log UFC/g de *L. monocytogenes* en piezas de carne bovina las cuales fueron pulverizadas con ácido láctico al 2% y al 4%. Después de la refrigeración 4°C durante cuatro días, obtuvieron una reducción de 0.3 log UFC/g para el ácido láctico al 2% y de 0.44 log UFC/g para el ácido láctico al 4% demostrando un mayor efecto bactericida del ácido a mayor concentración.

Finalmente, en el 41.4% de canales no hubo cambios con respecto a la presencia de *L. monocytogenes* en la superficie, es decir que fueron positivas antes y después del tratamiento. La presencia de esta bacteria después del tratamiento podría estar relacionada a lo planteado por Cheroutre *et al.* (1998) quienes concluyen que las bacterias que sobreviven a la exposición de ácidos orgánicos pueden reparar el daño producido en ellas por el ácido orgánico durante el almacenamiento a bajas temperaturas luego de lo cual se multiplican. Esto coincide con lo reportado por Ellin quien en el año 1999 encuentra elevados valores de *L. monocytogenes*; en carne almacenada en refrigeración la cual fue inoculada con esta bacteria y saneada por pulverización con ácido láctico (1.5%) y acético (4%).

Un estudio realizado por Rojas en el 2007, evaluó la acción microbiana del ácido láctico al 2% frente a *L. monocytogenes*; obteniendo una efectividad del 99.57%, sin embargo este porcentaje se mantuvo constante a los 5, 10 y 15 minutos después del tratamiento, lo que concuerda con lo señalado por Cheroutre *et al.* (1998), ambos estudios concluyen que la eficacia del ácido láctico es corta en el tiempo, adjudicándosele a este ácido orgánico una acción más de tipo bacteriostática que bactericida.

En un estudio realizado por Greer y Dilts (1994) quienes trataron grasa y tejido magro de cerdo en trozos obtenidos del músculo largo dorsal (*longissimus dorsi*) con ácido láctico al 3% mediante inmersión durante 15 segundos a una temperatura de 55°C previamente inoculados también por inmersión con 10^5 UFC/cm² de *L. monocytogenes* durante 15 segundos y almacenadas en refrigeración por 15 días a 4°C; reportaron que inmediatamente después del tratamiento con ácido láctico, hubo una reducción de 1 log UFC/cm² de *L. monocytogenes* con una reducción máxima de aproximadamente 2 log UFC/cm² después de siete días de almacenamiento a 4°C, pero en la grasa la reducción inicial fue de 2 a 3 log UFC/cm² y al cabo del cuarto día no se pudo encontrar. Por lo que concluyen que las bacterias son más sensibles a la acción del ácido si se encuentran en tejido adiposo, esto debido a que se produjo un mayor descenso del pH en grasa que en tejido magro con valores de 3.5 y 4.7 respectivamente debido a que el tejido magro tiene mayor capacidad amortiguadora que la grasa. Ello podría explicar también porque en este estudio se encontraron canales que seguían contaminadas con *L. monocytogenes* a pesar de ser tratadas con ácido láctico

La supervivencia de esta bacteria probablemente también esté relacionada con la formación de biopelículas por exopolímeros en un corto tiempo (30 minutos como mínimo pudiéndose extender a algunas horas), lo que le proporciona un ambiente favorable para su crecimiento sobre superficies bióticas o abióticas (Moreno, 2006). Todo ello puede incrementar su capacidad de supervivencia, como consecuencia, los métodos habituales de desinfección o el uso de antibióticos se muestran a menudo ineficaces contra las bacterias de las biopelículas. Así tenemos que Pan *et al.* (2006) demostraron que las biopelículas de *L. monocytogenes* desarrollaron resistencia a desinfectantes como el peróxido, el amonio cuaternario y el cloro. La formación de biofilm varía de acuerdo a la cepa de *L. monocytogenes* presente, según el estudio realizado por Folsom *et al.* (2006) los serotipos 1/2a y 4b de *L. monocytogenes* fueron quienes produjeron más biopelículas, esto coincide con los estudios que indican que en alimentos estas son las cepas más frecuentemente aisladas (Low *et al.*, 1993).

La contaminación cruzada podría también estar relacionada con este 41.4% de bacterias persistentes ya que podría no haber un efecto residual del ácido láctico. Esto coincide con

Carpenter *et al.* (2011) quienes compararon el efecto residual del ácido láctico y el ácido acético ambos al 2% siendo el primero de menor efecto residual, lo que coincide con lo señalado por Ellin (1999) quien menciona que el efecto residual suprime el crecimiento de *L. monocytogenes* en la carne de vacuno solo cuando esta se pulveriza con ácido láctico o acético al 2% antes de ser contaminado a diferencia de los ácidos orgánicos utilizados en inmersión donde la actividad residual permanece en la carne.

De acuerdo a lo establecido por la European Food Safety Authority (EFSA) en el 2011, la cantidad de ácido láctico que puede absorberse en la carne bovina después del tratamiento con este ácido orgánico está en un rango de 50-190 mg/kg y al consumir estas carnes hay aproximadamente una ingesta diaria de hasta 650 ug de ácido láctico residual/kg peso corporal/día en un alto consumo de carne. La cantidad de ácido láctico endógena en la sangre humana es aproximadamente de 90 mg/L en una condición de reposo. Sobre la base de estas estimaciones, el potencial de aumento de ácido láctico en el cuerpo después del consumo de carne tratada es insignificante. Por otra parte, teniendo en cuenta el hecho de que es una sustancia endógena, no se espera que el uso de ácido láctico en las canales de vacuno sea un motivo de preocupación de seguridad.

La aplicación de ácidos orgánicos no debe alterar el producto; por ejemplo Moreno, 2006 menciona que las repercusiones negativas de la aplicación de los ácidos orgánicos en la carne; como son el cambio de color de la grasa la cual se torna de un color gris oscuro, olores y sabores anormales; parecen que solo se producen a concentraciones mayores al 2%. Así tenemos que Woolthuis y Smulders (1985) emplearon ácido láctico mediante aspersión sobre las canales bovinas a concentraciones de 1% y 1.25% observando que no había alteración en el color de la superficie de la canal, esto coincide con lo reportado por Acuff *et al.* y Dickson en el año 1987 quienes tampoco observaron alteraciones en la coloración, sin embargo sugieren que los tratamientos mediante inmersión pueden ser perjudiciales para el color y el olor. Woolthuis y Smulders (1985) también evaluaron la acción del ácido láctico al 2% en ese caso si se produjo decoloración de la superficie de la canal sin embargo Pipek *et al.* (2005), quienes descontaminaron canales de bovino y de cerdo con ácido láctico al 2% observaron cambios sutiles en el color para la carne de bovino y en el caso del cerdo se mejoró la apariencia, por lo que concluyen que el ácido láctico a esta concentración puede emplearse para alargar la vida útil de la carne.

VI. CONCLUSIONES

1. *L. monocytogenes* es un patógeno que se encuentra presente durante el proceso de beneficio del ganado bovino contaminando la superficie de las canales antes o durante el proceso de refrigeración.
2. El tratamiento con ácido láctico al 2.5% no reemplaza las buenas prácticas ni la higiene durante el proceso de beneficio ni al almacenamiento en las cámaras frigoríficas, ya que a pesar de que se demostró su efecto bactericida en más del 50% de canales evaluadas; existió un porcentaje elevado de canales contaminadas 24 h después de su aplicación.
3. La refrigeración, como método para conservar la carne, es útil contra bacterias mesófilas pero no es suficiente para eliminar la presencia de *L. monocytogenes* de la superficie de canales debido a la capacidad que tiene la bacteria para soportar bajas temperaturas.
4. *L. monocytogenes* es un patógeno que se adapta a las condiciones del medio en la que se encuentra para poder sobrevivir

VII. RECOMENDACIONES

- Evaluar la acción antimicrobiana del ácido láctico a concentraciones mayores al 2.5% evaluando la carga bacteriana antes y después de la aplicación del ácido orgánico.
- Determinar la carga bacteriana de *L. monocytogenes* en la sala de refrigeración
- Implementar o mejorar las prácticas de manejo durante todo el proceso de beneficio para disminuir la presencia de este microorganismo.

VIII. LITERATURA CITADA

1. **Abram M, Doric M, 1997.** Primary *L. monocytogenes* infection in gestating mice. *Folia Microbiol* 42: 65-71.
2. **Acuff GR, Vanderzant C, Savell JW, Jones DK, Griffin DB, Ehlers JG. 1987.** Effect of acid decontamination of beef subprimal cuts on the microbiological and sensory characteristics of steaks. *Meat Sci.* 19:217-226.
3. **Adams MR, Moss MO. 2008.** Food Microbiology. 3ª Ed. Great British: RSC Publishing. 463 p.
4. **[AESAN] Agencia española de Seguridad Alimentaria y Nutrición 2010.** Biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria *Revista del Comité Científico* 12(2). p 37 – 61
5. **[AESAN] Agencia española de Seguridad Alimentaria y Nutrición 2011.** Estudios de vida útil para *L. monocytogenes* en determinados productos alimenticios. *Revista del Comité Científico* 14(3). p 43 – 59
6. **Aguado GJ, Faggian F, Jiménez M. 2006.** Infecciones por *Listeria* y *Erysipelothrix*. En: Ausina RV, Moreno GS. eds. *Tratado Seimc de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Ed. Madrid: Médica Panamericana. p. 451 – 456.
7. **Akkaya L, Cetinkaya Z, Alisarli M, Telli R, Gök V. 2008.** The prevalence of *E. COLI* O157/O157:H7, *L. monocytogenes* and *Salmonella spp.* on bovine carcasses in Turkey. *Journal of Muscle Foods.* 19: 420–429
8. **Álvarez CR. 2007.** Estadística aplicada a las ciencias de la salud. Ed. Díaz de Santos. 996 p.

9. **Allen S, Koneman E. 2008.** Bacilos grampositivos aerobios facultativos. En: Diagnóstico microbiológico: Texto y Atlas. 6ª ed. España: Médica Panamericana S.A. p 729 – 736
10. **Amerling C. 2001.** Tecnología de la carne. Ed. EUNED. 178 p.
11. **Ariyapitipun T, Mustapha A, Clarke AD. 2000.** Inhibition of *L. monocytogenes* Scott A on vacuum-packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid and nisin. J. Food Prot., 63:131-136.
12. **Bearson S, Bearson B, Foster JW. 1997.** Acid stress responses in enterobacteria. FEMS Microbiol Lett 43: 173-180.
13. **Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. 2009.** Food chemistry. 4ªEd. Springer. 1070 p.
14. **Bello GJ. 2010.** Carne y derivados. En: Gil HA. ed. Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos. 2ª Ed. España: Médica Panamericana S.A. p 27 – 54
15. **Blandino HL. 2005.** La industria de la carne bovina en Centroamérica: Situación y perspectivas. Ed. Costa Rica: Grafica Litho Offset. 74 p.
16. **Blackburn C, McClure PJ. 2002.** *Listeria monocytogenes*. En: Bell C, Kyriakides A, eds. Foodborne pathogens: Hazards, risk analysis and control. Ed. England: Woodhead. p. 337 – 361
17. **Bravo MF. 2004.** Manejo higiénico de los alimentos. Ed. México: Limusa S.A. 115 p.
18. **Brock T, Madigan M, Martinko J, Parker J. 2003.** Conservación de los alimentos y enfermedades microbianas transmitidas por alimentos. En: Biología de los microorganismos. 10ª Ed: Pearson. p 942 – 956.
19. **Buchanan RL, Golden MH, Whiting RC. 1993.** Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of *L. monocytogenes* inactivation. J. Food Protect 56(6):474–478.
20. **CAC/GL 61. 2007.** Codex Alimentarius: Directrices sobre la aplicación de principios generales de higiene de los alimentos para el control de *L. monocytogenes* en los alimentos. p 1-30. Disponible en: <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/en/?provide=standards&orderField=fullReference&sort=asc&num1=CAC/GL>

21. **Carpenter CE, Smith JV, Broadbent JR. 2011.** Efficacy of washing meat surfaces with 2% levulinic, acetic, or lactic acid for pathogen decontamination and residual growth inhibition. *Meat Science* 88 : 256–260
22. **Carrillo L, Audisio MC. 2007.** Manual de microbiología de los alimentos. 1ª Ed. Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNJU. Argentina. 193 p.
23. **Castillo A, Lucia LM, Goodson KJ, Savell JW, Acuff G.R. 1998.** Comparison of water wash, trimming, and combined, hot water and lactic acid treatments for reducing bacteria of fecal origin on beef carcasses. *Journal of food protection*, 61(7):823-828.
24. **[CDC] Centros para el control y prevención de enfermedades. 2011.** USA: [Internet], [24 Agosto 2012]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/>
25. **Cheroutre VM, Lebert I, Hebraud M, Labadie JC, Lebert A. 1998.** Effects of pH or Aw stress on growth of *L. monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 42(1–2):71–77
26. **Conner DE, Kotrola JS, Mikel WB, Tamblyn KC. 1997.** Effects of acetic-lactic acid treatments applied to beef trim on populations of *Escherichia coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* in ground beef. *Journal of Food Protection* N°12. p. 1560-1563
27. **Coruja JC. 2012.** Ocorrência de *L. monocytogenes* em instalações, utensílios e carcaças em matadouro-frigorífico de bovinos localizado no Rio Grande do Sul. Tesis de Médico Veterinario. Faculdade de Veterinária. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 24 p
28. **Datta AR. 2003.** *L.monocytogenes*. En: Miliotis MD., Bier JW. eds. *International Handbook of Foodborne Pathogens*. New York: Marcel Dekker, INC. p. 105-122
29. **Decreto Supremo (DS) N° 015-2012-AG.** Reglamento Tecnológico de carnes. [Internet], [21 agosto 2014]. Disponible en: http://www.peru.gob.pe/normas/docs/DS_015_2012_AG.pdf
30. **Decisión (CE) 765. 2006.** [Internet], [06 Junio 2013]. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001D0471&qid=1410305742994&from=ES>
31. **Dikson JS. 1992.** Acetic acid action on beef tissue surfaces contaminated with *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Science*. 57: 297–301

32. **Dirckx P, Davies D. (2003).** Center for Biofilm Engineering. Five stages of biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. Disponible en: http://www.genomenetwork.org/articles/06_02/biofilms_image1.shtml
33. **Dixon ZR, Vanderzant C, Acuff GR, Savell JW, Jones DK. 1987.** Effect of acid treatment of beef strip loin steaks on microbiological and sensory characteristics. *International Journal of Food Microbiology*. 5:181-186
34. **Doores S. 2005.** Organic acids. En: Davidson M, Sofos J, Branen A, eds. *Antimicrobials in food*. 3^a ed. USA: CRC Press. Taylor & Francis Group. p 91-142.
35. **Drago SM. 2007.** Lactoferrina: producción industrial y aplicaciones. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 38 (3): 30-38.
36. **Dramsi S, Biswas I, Maguin E, Braun L, Mastroeni P, Cossart P. 1995.** Entry of *Listeria monocytogenes* Into Hepatocytes Requires the Expression of Inl B, a Surface Protein of the Internalin Multigene Family. *Mol. Microbiol*. 16: 251-261.
37. **[EFSA] European Food Safety Authority. 2011.** Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of lactic acid for the removal of microbial surface contamination of beef carcasses, cuts and trimmings. *EFSA Journal* 9(7): 2317
38. **El-Khateib T, Yousef AE, Ockerman HW. 1993.** Inactivation and attachment of *Listeria monocytogenes* on beef muscle treated with lactic acid and selected bacteriocins. *J. Food Prot*. 56: 29–33.
39. **Elmali M, Yaman H, Tekinşen K, Öner S, Çekin E. 2012.** Inhibitory effects of different decontamination agents on the levels of *L. monocytogenes* in the experimentally inoculated raw beef samples in the laboratory conditions. *Kafkas Univ. Vet. Fak Derg* 18(5): 763-768.
40. **Ellin DM. 1999.** Control of *Listeria* in meat. Ed. Food Research Institute, University of Wisconsin–Madison. 24 p.
41. **Ellin DM. 2001.** Virulence Characteristics of *L. monocytogenes*. Ed. Food Research Institute, University of Wisconsin–Madison. p 1-13.
42. **[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2001.** Directrices para el manejo, transporte y sacrificio humanitario del ganado. [Internet], [06 Diciembre 2012]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/x6909s/x6909s00.htm>.

43. **[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014.** [Internet], [06 Junio 2014]. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/background.html>.
44. **Figuera BE, Cabello AM, Villalobos LB, Del Valle MY, Vallenilla OM. 2005.** Crecimiento de *L. monocytogenes* en atún ahumado empacado al vacío. *Zootecnia Trop.* 23(2) p. 171-181.
45. **Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL, Brondum J, Hayes PS, Plikaytis BD, Holmes MB, Audurier AC, Broome V, Reingold AL. 1985.** Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New Engl. J. Med.* 312:404–407.
46. **Flores RC, Leal M, Ruiz RJ, Sánchez E, Moreno M, Castro G, Barboza Y. 2011.** Tiempo de almacenamiento e identificación de bacterias ácido lácticas en carnes de res picada empacadas al vacío. *Revista Científica, FCV-LUZ* Vol. 21 (5). p. 425 – 433.
47. **Folsom J, Siragusa G, Frank J. 2006.** Formation of biofilm at different nutrient levels by various genotypes of *L. monocytogenes*. *J. Food Prot.* 69(4):826-834.
48. **Gallego MI, Manrique PC, Torres OA, Ramírez MF. 2005.** *Listeria monocytogenes* en canales de ganado Holstein en una planta de sacrificio en Bogotá. En: *Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica*: 8(2): 95 – 101.
49. **Gallo C, Mamani LL. 2011.** Composición química y calidad instrumental de carne de bovino, llama (*lama glama*) y caballo; bajo un sistema de crianza extensiva. *Rev Inv Vet Perú.* 22(4):301-311.
50. **Geldres AC. 1957.** *L. monocytogenes* en ovinos. Tesis de MédicoVeterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos.
51. **Ghanbari M, Jami M. 2013.** Lactic acid bacteria and their bacteriocins: a promising approach to seafood biopreservation. En: Kongo JM. ed. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. Ed. Croatia: InTech. p 381-404.
52. **Gilot P, Andre P, Content J. 1999.** *L. monocytogenes* possesses adhesins for fibronectin. *Infection and immunity* Vol. 67 (12) p. 6698–6701.
53. **Gil HA, Juárez IM, Fontecha AJ. 2010.** Influencia de los procesos tecnológicos sobre el valor nutritivo de los alimentos. En: Gil HA. ed. *Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. 2ª Ed. España: Médica Panamericana S.A. p 529 – 562.

54. **Goulet V, Jacquet C, Vaillant V, Rebière I, Mouret E, Lorente C, Maillot E, Stainer F, Rocourt J. 1995.** Listeriosis from consumption of raw milk cheese. *Lancet* 345:1581–1582.
55. **Greer G, Dilts BD. 1994.** Lactic acid inhibits growth on pork lean and fat. *Proceedings 40th International Congress of Meat Science and Technology*, La Haya - Holanda.
56. **Guevara J, Pereda J, Roel S. 1979.** Human listeriosis in Perú. *Tropenmed Parasitol* 30:59-61.
57. **Guerrero LI. 2004. Productos cárnicos.** En: García GM, Quintero RR, López MA. *Biotecnología alimentaria*. Ed. Limusa. México DF. p 225 – 262.
58. **GUIAVETA. 2001.** Guía para el establecimiento de sistemas de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y la Investigación de brotes de Toxi-Infecciones Alimentarias. [Internet], [28 setiembre 2013]. Disponible en: <http://epi.minsal.cl/epi/html/software/guias/Veta/E/homepage.htm>.
59. **Hughey VL, Wilger PA, Johnson EA. 1989.** Antibacterial activity of hen egg white lysozyme against *L. monocytogenes* Scott A in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(3):631–638.
60. **INEI. 2014.** Lima: Instituto Nacional de Estadística e Informática. [Internet], [29 agosto 2014]. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/documentosdigitales/bvsde/texcom/cd045364/PerCapitaAlimentos.pdf>
61. **[ISO] International Organization for Standardization 17604. 2003.** Microbiology of food and animal feeding stuffs-carcass sampling for microbiological analysis.
62. **Izquierdo P, Veciana NT, Vidal C. 1999.** Las sustancias nutritivas: Grupos y funciones. En: Hernández RM, Sastre G, eds. *Tratado de nutrición*. Ed. Madrid: Díaz de Santos. p 327-344
63. **James C. 2002.** New developments in decontaminating raw meat. En: Kerry JP, Kerry JF, Ledward D. eds. *Meat Processing: Improving*. Ed. England: Woodhead Publishing Limited. P 259-282.
64. **James SJ, James C. 2002.** Meat Refrigeration: Improving. Ed. England: Woodhead Publishing Limited. 347 p.

65. **Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. 2009.** Listeriosis de origen alimentario. En: Microbiología moderna de los alimentos. 5ª ed. Acribia S.A. España. p. 586 – 612.
66. **Jeong D, Frank J. 1994.** Growth of *L.monocytogenes* at 10 °C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. Journal of Food Protection 53: 224-227.
67. **Kuhn M, Goebel W. 2007.** Molecular Virulence Determinants of *Listeria monocytogenes*. En: Elliot TR, Elmer HM, eds. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. 3a Ed. Taylor and Francis Group. p. 111- 155.
68. **Lado BH, Yousef AE. 2007.** Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. En: Ryser ET, Marth EH, eds. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. 3a Ed. Taylor and Francis Group. p 157-213.
69. **Larraín D, Carvajal J. 2008.** Los aspectos fisiopatológicos y moleculares involucrados en el traspaso de *L. monocytogenes* a través de la barrera placentaria. Boletín Escuela de Medicina U.C., Pontificia Universidad Católica de Chile 33:1 p 20-30.
70. **Larson AE, Yu RR, Lee OA, Price S, Haas GJ, Johnson EA. 1996.** Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. Int. J. Food Microbiol. 33(2–3):195–207.
71. **Lawrie RA, Ledward DA. 2006.** Lawrie's Meat Science. 6ª ed. Cambridge, England: Woodhead Publishing. 442 p.
72. **Linnan, MJ, Mascola L, Lou XD, Goulet V, May S, Salminen C, Hird DW, Yonkura ML, Hayes P, Weaver R, Audurier A, Plikaytis BD, Fannin SL, Kleks A, Broome CV. 1988.** Epidemic listeriosis associated with Mexican style cheese. New Engl. J. Med. 319:823–828.
73. **López V, Suárez M., Chico-Calero I, Navas J, Martínez-Suárez JV. 2006.** *L. monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos? Revista Argentina de Microbiología 38: 224-234.
74. **Lorber B. 1997.** Listeriosis. Clin Infect Dis; 24: 1-11.
75. **Low J C, Wright F, McLauchlin J, Donachie W. 1993.** Serotyping and distribution of listeria isolates from cases of ovine listeriosis. Vet Rec 133: 165-166.

76. **Mackey BM, Forestiere K, Isaacs NS, Stenning R, Brooker B. 1994.** The effect of high hydrostatic pressure on *Salmonella thompson* and *L. monocytogenes* examined by electron microscopy. *Lett. Appl. Microbiol.* 19(6):429–432.
77. **Mateauda NJ. 2013.** Estudio de la microflora bacteriana y cambios fisicoquímicos en carne bovina envasada al vacío y almacenada en frío. Tesis de Licenciatura en Bioquímica. Uruguay: Universidad de la Republica. 61 p
78. **Marín MK. 2011.** Desarrollo de un método para desinfección de canales de avestruz, utilizando ácidos orgánicos. Tesis de Ingeniería de Alimentos. Guayaquil –Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral. 80 p.
79. **Mariño AG., Vilca LM., Ramos DD. 2005.** Evaluación del pH en canales de toros Holstein (*Bos taurus*) y Nelore (*Bos indicus*). *Rev. Inv. Vet. Perú* 16 (1):90-95.
80. **Martínez AO, Aguilera GC, Gil HA. 2010.** Nuevas fuentes de nutrientes En: Gil HA. ed. *Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. 2ª Ed. España: Médica Panamericana S.A. p 367 – 398.
81. **MacDonald PD, Whitwam R, Boggs J, MacCormack J, Anderson K, Reardon J, Saah J, Graves L, Hunter S, Sobel J. 2005.** Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican style cheese. *Clin. Infect. Dis.* 40:677–682.
82. **McEvoy JM, Doherty AM, Sheridan JJ, Thomson–Carter FM, Garvey P, McGuire L, Blair IS, McDowell DA. 2003.** The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157:H7 at a commercial beef abattoir *J. Appl. Microbiol.* 95: 256–266.
83. **Minor PH. 1998.** Cambios en parámetros fisicoquímicos relacionados con la calidad de la carne de cerdo sometida a fermentación láctica como método de bioconservación. Tesis de Maestría. México DF: Univ. Autónoma Metropolitana. 129 p.
84. **Minor PH, Guerrero LI, Ponce AE. 1999.** Tendencias en la aplicación de bacterias lácticas para conservar carne. [Internet], [16 Mayo 2013]. Disponible en: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_XIII/CXI-II-40.pdf.
85. **MINAG. 2014.** Lima: Ministerio de Agricultura. [Internet], [29 agosto 2014]. Disponible en: www.minag.gob.pe/.

86. **MINSAL. Ministerio de Salud 2008.** Chile. [Internet], [24 Agosto 2012]. Disponible en: http://www.minsal.gob.cl/portal/url/page/minsalcl/g_nuevo_home/nuevo_home.html.
87. **Moreno GB. 2006.** La higiene de la Carnización II: Descontaminación de canales. En: Higiene e Inspección de carnes I. Ed. España: Díaz de Santos. p 258-268.
88. **Moore DS. 2005.** Estadística aplicada 2ª ed. Barcelona: Antoni Bosch. 874 p.
89. **Murray PR, Rosenthal KS, Pfürer MA. 2006.** Microbiología médica. 5ª ed. España: Elsevier. 963 p.
90. **Nortje GL, Nel L, Jordan E, Badenhorst K, Goedhart G, Holzapfel WH, Grimbeek RJ. 1990.** A quantitative survey of a meat production chain to determine the microbial profile of the final product. Journal Food Protection, Vol.53, N° 5, 1990. p 411-417.
91. **Norrung B, Kirk JA, Buncic S. 2009.** Main concerns of pathogenic microorganisms in meat. En: Toldra F. ed. Safety of Meat and Processed Meat. Ed. Springer. p 3-30.
92. **NTS N° 071- MINSA/DIGESA-V.01. 2008.** Criterios Microbiológicos de Calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. [Internet], [21 abril 2014]. Disponible en: <http://www.digesa.minsa.gob.pe/NormasLegales/Normas/RM591MINSANORMA.pdf>.
93. **Ojeda JC, Vásquez VG. 2009.** Aplicación de ácidos orgánicos en la reducción de microorganismos aerobios mesófilos y coliformes totales y fecales en canales de bovinos. En: Revista Tecnológica ESPOL: 20 (20).
94. **Olivares R. 2009.** *L. monocytogenes*: an old bacteria, an ongoing challenge. Medwave 2009 Jun: 9(6).
95. **Olsen SJ, Patrick M, Hunter SB, Reddy V, Kornstein L, MacKenzie WR, Lane K, Bidol S, Stoltman GA, Frye DM, Lee I, Hurd S, Jones TF, LaPorte TN, Dewitt W, Graves L, Wiedmann M, Schoonmaker-Bopp DJ, Huang AJ, Vincent C, Bugenhagen A, Corby J, Carloni ER, Holcomb ME, Woron RF, Zansky SM, Dowdle G, Smith F, Ahrabi-Fard S, Ong AR, Tucker N, Hynes NA, Mead P. 2005.** Multistate outbreak of *L. monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat. Clin Infect Dis. 40(7):962-967.
96. **[OMS] Organización Mundial de la salud. 2013.** USA: [Internet], [21 Setiembre 2013]. Disponible en: http://www.who.int/topics/food_safety/es/.

97. **Ordoñez PJ, De la Hoz PL. 1999.** Carnes, Pescados y Huevos. En: Hernández RM y Sastre GA, eds. Tratado de nutrición. Ed. Díaz de Santos. p 363-376.
98. **Ostling CE, Lindgren SE. 1993.** Inhibition of enterobacteria and *Listeria* growth by lactic, acetic and formic acids. J. Appl. Bacteriol. 75(1):18-24.
99. **Özdemir H, Yildirim Y, Kuplülü Ö, Koluman A, Göncüoğlu M, Gökhan I. 2006.** Effects of lactic acid and hot water treatments on *Salmonella typhimurium* and *L. monocytogenes* on beef. Food Control. 17(4):299-303.
100. **Painter J, Slutsker L. 2007.** Listeriosis in Humans. En: Ryser ET, Marth EH, eds. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. 3ª Ed. Taylor and Francis Group. p 85-109.
101. **Pan Y, Breidt F, Kathariou S. 2006.** Resistance of *L. monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. Appl. Environ. Microbiol. 72:12.
102. **Pascual AM, Calderón PV. 1999.** Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. Ed. Díaz de Santos. 464 p.
103. **Pascual AM, Calderón PV. 2002.** Carnes. En: Microbiología Alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas. 2ª ed. Madrid: Díaz de Santos S.A. p 219-225.
104. **Pascual AM. 2005.** Enfermedades de origen alimentario. Ed. España: Díaz de Santos. 208 p.
105. **Pereda J, Orbegoso C, Larch M. 1963.** Listeriosis en el recién nacido. Reporte de un caso. Rev. Médica Peruana 32(334). p 135 -140.
106. **Pereda J. 1977.** Estudio de las lesiones histológicas de la listeriosis del feto y el recién nacido. Tesis Doctoral. Lima, Perú. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 44 p.
107. **Pérez RC, Mercado RM, Carrascal CA. 2008.** Incidencia de *Listeria* spp. en carcasas de pollo congelado en un supermercado del nororiente de Bogotá. NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas 6(10): 141-146.
108. **Pipek P, Houška M, Jeleníková J, Kýhos K, Hoke K, Šikulová, M. 2004.** Microbial decontamination of beef carcasses by combination of steaming and lactic acid spray. Journal of Food Engineering 67(3): 309-315.

109. **Pipek P, Šikulová, M, Jeleníková J, Izumimoto M. 2005.** Colour changes after carcasses decontamination by steam and lactic acid. *Meat Science* 69: 673–680
110. **Price JF, Schweigert BS. 1994.** Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. Ed. Zaragoza- España: Acribia, 581 p.
111. **Pumarola A, Rodriguez TA, Garcia RJ, Piedrola AG. 1992.** Microbiología y Parasitología Médica. 2ª Ed. España: SALVAT S. A. 916 p.
112. **Rahman S. 2003.** Manual de conservación de los alimentos. Ed. Acribia S.A. Zaragoza. España. 863 p.
113. **Reglamento (CE) N° 1441. 2007.** [Internet], [10 junio 2013]. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R1441&qid=1410156372336&from=ES>
114. **Reglamento (UE) N° 101. 2013.** [Internet], [10 abril 2013]. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R0101&qid=1410305856350&from=ES>
115. **Reguera JI, Nieto JC, Eiros JM, González SZ, Ortiz De LR, Rodríguez TA. 1995.** Infección alimentaria por *L. monocytogenes*. En: Boletín de Pediatría: 36 (157). Ed. Madrid (España): GARCI S.A. p 215 – 224.
116. **Requena T, Pelaez C. 1995.** Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Rev Española Cienc. Tecnol. Al.* 35 (1): 1.
117. **Rocourt J, Buchrieser C. 2007.** The genus *Listeria* and *L. monocytogenes*: Phylogenetic position, taxonomy and identification. En: Elliot TR, Elmer HM, eds. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. 3ª Ed. Taylor and Francis Group. p 1-20.
118. **Rojas RC. 2007.** Evaluación de cuatro desinfectantes sobre *L. monocytogenes* aislada de productos cárnicos crudos de una planta de procesados en Bogotá. Tesis de Microbiólogo Industrial. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. 104 p.
119. **Sofos JN. 1994.** Microbial growth and its control in meat, poultry and fish. *Advances in Meat Research* Vol. 9 p. 359-403.
120. **Stiles ME. 1996.** Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70:235-249.

121. **Tipán EJ. 2012.** Determinación del mayor índice de *L. monocytogenes* de tres etapas de faenamiento de bovinos en un camal. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Cuenca – Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana. 91 p.
122. **Todar K. 2012.** Todar's Online Textbook of Bacteriology. [Internet], [28 noviembre 2012]. Disponible en: <http://www.textbookofbacteriology.net>.
123. **Torres K, Sierra S, Poutou R, Carrascal A, Mercado M. 2005.** Patogénesis de *L. monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. Rev. MVZ Córdoba 10:1 p 511-543.
124. **Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. 2001.** Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microbiol. Rev. 14(3):584-640.
125. **Villamil D. 2005.** *L. monocytogenes* en canales de bovinos cebú en una planta de sacrificio de la sabana de Bogotá - Colombia. Tesis de Microbiólogo industrial. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. 52 pp.
126. **Villegas CM. 2010.** Caracterización molecular de cepas clínicas de *L.monocytogenes* aisladas en el Hospital Madre Niño San Bartolomé de Lima durante el periodo 2001-2005. Tesis de Magister en Microbiología. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 92 p.
127. **Walker S, Archer P, Banks J. 1990.** Growth of *L. monocytogenes* at refrigeration temperatures. J. Appl. Bact. 68:157-162.
128. **Wieczorek K, Dmowska K, Osek J. 2012.** Prevalence, characterization and antimicrobial resistance of *L. monocytogenes* isolates from Bovine hides and carcasses. Appl. Environ Microbiol. 78(6): 2043–2045.
129. **[WinEpi]. Working in Epidemiology. 2006.** [Internet], [28 noviembre 2013]. Disponible en: <http://www.winepi.net/>.
130. **Woolthuis CH, Smulders F. 1985.** Microbial decontamination of calf carcasses by lactic acid sprays. Journal of Food Protection. N°10. p. 832-837.
131. **Zhang SS, Mustapha A. 1999.** Reduction of *L. monocytogenes* and *E. coli* O157:H7 numbers on vacuum-packaged fresh beef treated with nisin or nisin combined with EDTA. J. Food Protect. 62(10):1123–1127.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Principales enfermedades transmitidas por los alimentos (GUIA VETA, 2001)

Enfermedad	Agente etiológico y fuente	Período de incubación o latencia	Signos y síntomas	Alimentos implicados	Factores que contribuyen a los brotes de ETAS
Bacillus cereus gastroenteritis (tipo emético)	Exoenterotoxina de <i>B. cereus</i>	De 1/2 a 5 horas	Náuseas, vómito y diarreas	Arroz cocido o frito, platos de arroz con carne	Almacenaje de alimentos cocinados a temperaturas altas, alimentos cocinados en depósitos grandes, preparación varias horas antes de servir el alimento
Intoxicación estafilocócica	Exoenterotoxinas A, B, C, D y E de <i>Staphylococcus aureus</i> . Estafilococos de la nariz, piel y lesiones	de 1 a 8 horas, promedio de 2 a 4 horas	Náuseas, vómitos, arcadas, dolores abdominales, diarrea, postración	Jamón, productos de carne de res o aves, pasteles rellenos de crema, mezclas de alimentos, restos de comida	Refrigeración deficiente, trabajadores que tocaron alimentos cocidos, preparación de alimentos varias horas antes de servirlos, trabajadores con infecciones purulentas, mantenimiento de alimentos a temperaturas cálidas (incubación bacteriana), fermentación de alimentos anormalmente poco ácidos
Infecciones por estreptococos beta-hemolíticos	<i>S. pyogenes</i> de la garganta y lesiones de personas infectadas	De 1 a 3 días	Faringitis, fiebre, náuseas, vómitos, rinorrea, a veces erupción cutánea	Leche cruda, alimentos con huevo	Trabajadores que tocaron alimentos cocidos, trabajadores con infecciones purulentas, refrigeración insuficiente, cocción o recalentamiento inapropiado, preparación de alimentos varias horas antes de servirlos

Continuación

Enfermedad	Agente etiológico y fuente	Período de incubación o latencia	Signos y síntomas	Alimentos implicados	Factores que contribuyen a los brotes de ETAS
Gastroenteritis por <i>Bacillus cereus</i> (Tipo diarreico)	Exoenterotoxina de <i>B. cereus</i> . Organismo en el suelo	De 8 a 16 horas; promedio de 12 horas	Náuseas, dolores abdominales, diarrea	Productos de cereales, arroz, natillas y salsas, albóndigas, salchichas, vegetales cocidos, para deshidratada reconstituida	Refrigeración empleada insuficiente, almacenamiento de alimentos a temperaturas cálidas (incubación bacteriana), preparación de alimentos varias horas antes de servirlos, recalentamiento impropio de restos de comida
Enteritis por <i>Clostridium perfringens</i>	Endoenterotoxina formada en los intestinos, en las heces humanas o de animales y en el suelo	de 8 a 22 horas, promedio de 10 horas	Dolores abdominales, diarrea	Carne de res o de ave cocida, caldos, salsas y sopas	Refrigeración empleada insuficiente, almacenamiento de alimentos a temperaturas cálidas (incubación bacteriana), preparación de alimentos varias horas antes de servirlos, recalentamiento impropio de restos de comida
Diarreas por aeromonas	<i>Aeromonas</i> <i>Hydrophila</i>	1 a 2 días	Diarrea acuosa, dolor abdominal, náusea, dolor de cabeza	Pescados, mariscos, caracoles, agua	Contaminación de los alimentos en el mar o aguas superficiales

Continuación

Enfermedad	Agente etiológico y fuente	Período de incubación o latencia	Signos y síntomas	Alimentos implicados	Factores que contribuyen a los brotes de ETAS
Campylobacteriosis	Campylobacter jejuni	2 a 7 días usualmente entre 3 y 5	Dolor abdominal, diarreas con mucus y sangre, dolor de cabeza, mialgias, fiebre, anorexia, náusea, vómitos. Secuela: Síndrome de Guillain-Barre	Leche cruda, hígado de res, almejas crudas, agua	Tomar leche cruda, manipular productos crudos, comer carne de aves crudas o semicrudas, inadecuada cocción o pasteurización, contaminación cruzada con carne cruda
Cólera	Endoenterotoxina de <i>Vibrio cholerae</i> biotipos clásico y <i>El Tor</i> . En heces de personas infectadas	De 1 a 3 días	Diarrea acuosa y profusa (tipo agua de arroz), vómitos, dolor abdominal, deshidratación, colapso,	Pescados y mariscos crudos, alimentos lavados o preparados con agua contaminada	Obtención de productos marinos contaminados con agua residuales de zonas endémicas, falta de higiene personal, trabajadores infectados, cocción inapropiada, empleo de agua contaminada para lavar alimentos, evacuación deficiente de aguas residuales, utilización del contenido de letrinas como fertilizante
Gastroenteritis por <i>E. coli</i> patógena	Cepa enterotoxígena o invasoras.	De 5 a 48 horas, promedio de 10 a 24 horas	Dolor abdominal, diarrea, náuseas, vómitos, fiebre, escalofríos, cefalalgia, mialgia	Diversos alimentos, agua	Trabajadores infectados que tocan los alimentos, refrigeración insuficiente, cocción inapropiada, limpieza y desinfección deficiente del equipo

Continuación

Enfermedad	Agente etiológico y fuente	Período de incubación o latencia	Signos y síntomas	Alimentos implicados	Factores que contribuyen a los brotes de ETAS
Diarreas por <i>E. coli</i> Enterohemorrágica o verotoxigénica	<i>E. coli</i> O157:H7, O26, O111, O115, O113	1 a 10 días usualmente 2 a 5 días	Diarrea acuosa y sanguinolenta, dolor abdominal severo, sangre en la orina. Secuela: Síndrome urémico hemolítico	Hamburguesa, leche cruda, embutidos, yogur, lechuga, agua	Hamburguesa hecha de carne de animales infectados, consumo de carne y leche cruda, inadecuada cocción, contaminación cruzada, personas infectadas que tocan los alimentos listos para el consumo, inadecuada desecación y fermentación de carnes.
Diarrea por <i>E. coli</i> Enteroinvasiva	Cepas de <i>E. Coli</i> Enteroinvasiva	1/2 a 3 días	Dolor abdominal severo, fiebre, diarrea acuosa, (usualmente con mucus y sangre presentes), tenesmo	Ensaladas y otros alimentos que no son tratados higiénicamente, agua	Inadecuada cocción, personas infectadas que tocan alimentos listos para el consumo, no lavado de manos después de la defecación, almacenaje de alimentos a temperatura ambiente, guardar alimentos en el refrigerador en grandes contenedores, preparar alimentos varias horas antes de servirlos, inadecuado recalentamiento de los alimentos
Enteritis por Plesiomonas	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	1 a 2 días	Diarrea con mucus y sangre en las heces	Agua	Cocción inadecuada

Continuación

Enfermedad	Agente etiológico y fuente	Período de incubación o latencia	Signos y síntomas	Alimentos implicados	Factores que contribuyen a los brotes de ETAS
Diarrea por <i>E. coli</i> Enterotoxigénica	Cepas de <i>E. Coli</i> Esterotoxigénica	1/2 a 3 días	Diarrea acuosa profusa (sin mucus ni sangre) dolor abdominal vómitos, postración, deshidratación, fiebre ligera	Ensaladas y otros alimentos que no son subsecuentemente tratados térmicamente, quesos frescos, agua	Inadecuada cocción, personas infectadas que tocan alimentos listos para el consumo, no lavado de manos después de la defecación, almacenaje de alimentos a temperatura ambiente, guardar alimentos en el refrigerador en grandes contenedores, preparar alimentos varias horas antes de servirlos, inadecuado recalentamiento de los alimentos, uso de leche cruda para hacer queso.
Salmonelosis	Varios serotipos de Salmonella de heces de personas y animales infectados	De 6 a 72 horas, promedio de 18 a 36 horas	Dolor abdominal, diarrea, escalofríos, fiebre, náuseas, vómitos, malestar	Carne de res y aves y sus derivados, derivados de huevo, otros alimentos contaminados por salmonelas	Refrigeración empleada insuficiente, almacenamiento de alimentos a temperaturas cálidas (incubación bacteriana), cocción y recalentamiento inapropiados, preparación de alimentos varias horas antes de servirlos, contaminación cruzada, falta de limpieza del equipo, trabajadores infectados obtención de alimentos de fuentes contaminadas

Continuación

Enfermedad	Agente etiológico y fuente	Período de incubación o latencia	Signos y síntomas	Alimentos implicados	Factores que contribuyen a los brotes de ETAS
Shigelosis	<i>Shigella flexneri</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>S. sonnei</i> y <i>S. boydii</i>	De 1/2 a 7 días, generalmente de 1 a 3 días	Dolores abdominales, diarrea, heces sanguinolentas y mucoides, fiebre	Todo alimento listo para el consumo contaminado, con frecuencia ensaladas, agua	Trabajadores infectados que tocan los alimentos, refrigeración insuficiente, cocción y recalentamiento inadecuados
Gastroenteritis por <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> de agua de mar o productos marinos	De 2 a 48 horas, promedio de 12 horas	Dolores abdominales, diarrea, náuseas, vómitos, fiebre, escalofríos, cefalalgia	Alimentos marinos crudos o recontaminados	Cocción inapropiada, refrigeración insuficiente, contaminación cruzada, falta de limpieza del equipo, empleo de agua de mar para preparar alimentos
Diarreas por Yersiniosis	<i>Yersinia enterocolítica</i> , <i>pseudotuberculosis</i>	1 a 7 días	Dolor abdominal, fiebre ligera, dolor de cabeza, malestar, anorexia, náusea, vómitos	Leche cruda, agua	Cocción inadecuada o pasteurización, contaminación cruzada, ingredientes, aguas contaminadas

Continuación

Enfermedad	Agente etiológico y fuente	Período de incubación o latencia	Signos y síntomas	Alimentos implicados	Factores que contribuyen a los brotes de ETAS
Botulismo	Exoneurotoxinas A, B, E, y F de <i>Clostridium botulinum</i> . Las esporas se encuentran en el suelo e intestinos de animales	De 2 horas a 8 días, promedio de 18 a 36 horas	Vértigo, visión doble o borrosa, sequedad de la boca, dificultad para deglutir, hablar y respirar; debilidad muscular, estreñimiento, parálisis respiratoria. Síntomas gastrointestinales pueden preceder a los neurológicos. Con frecuencia es mortal	Conservas caseras poco ácidas, pescado empacado al vacío; huevos de pescado fermentados, peces y mamíferos marinos, pescado no eviscerado	Elaboración inapropiada de alimentos enlatados y pescado ahumado, fermentaciones no controladas
Infección por <i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	16 horas	Septicemia, fiebre, malestar, postración, casos típicos con problemas hepáticos previos	Ostras y almejas crudas	Personas con problemas hepáticos
Carbunco	<i>Bacillus anthracis</i>	De 3 a 5 días	Gastroenteritis, vómitos, deposiciones hemorrágicas	Carne de animales enfermos	Manifestaciones clínicas y antecedentes de haber consumido carne de animales enfermos

Continuación

Enfermedad	Agente etiológico y fuente	Período de incubación o latencia	Signos y síntomas	Alimentos implicados	Factores que contribuyen a los brotes de ETAS
Brucelosis	<i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> y <i>B. suis</i> de animales infectados	De 7 a 21 días	Fiebre, escalofríos, sudores, debilidad, malestar, cefalalgia, mialgia y artralgia, pérdida de peso	Leche cruda, queso de cabra hecho con leche cruda	Fallos en la pasteurización de la leche, ganado infectado por brucelas
Tuberculosis	<i>Micobacterium bovis</i>		Lesiones pulmonares, también en riñones, hígado, bazo y ganglios	Leche	Consumo de leche cruda
Listeriosis	<i>L. monocytógenes</i>	3 a 70 días, usualmente 4 a 21 días	Fiebre, dolor de cabeza, náuseas, vómitos, aborto, meningitis, encefalitis y sepsis	Leche, queso fresco, paté, hortalizas crudas, carnes crudas, , carnes procesadas	Inadecuada cocción, fallas en la pasteurización de la leche, prolongada refrigeración
Fiebre tifoidea y paratifoidea	<i>Salmonella typhi</i> de heces de personas infectadas, otros serotipos casos de paratifoidea	De 7 a 28 días, promedio de 14 días	Malestar, cefalalgia, fiebre, tos, náuseas, vómitos, estreñimiento, dolor abdominal, escalofríos, manchas rosadas, heces sanguinolentas	Mariscos, alimentos contaminados por trabajadores, leche cruda, queso, berros, agua	Trabajadores infectados que tocan los alimentos, falta de higiene personal, cocción inapropiada, refrigeración insuficiente, evacuación de aguas residuales inadecuada, obtención de alimentos de fuentes contaminadas, recogida de mariscos de aguas contaminadas por líquido de cloacas

Anexo 2. Cepas aisladas de *L. monocytogenes* según tipo de muestra y grupo poblacional atendido en el Hospital San Bartolomé de Lima entre 2001 y 2005.

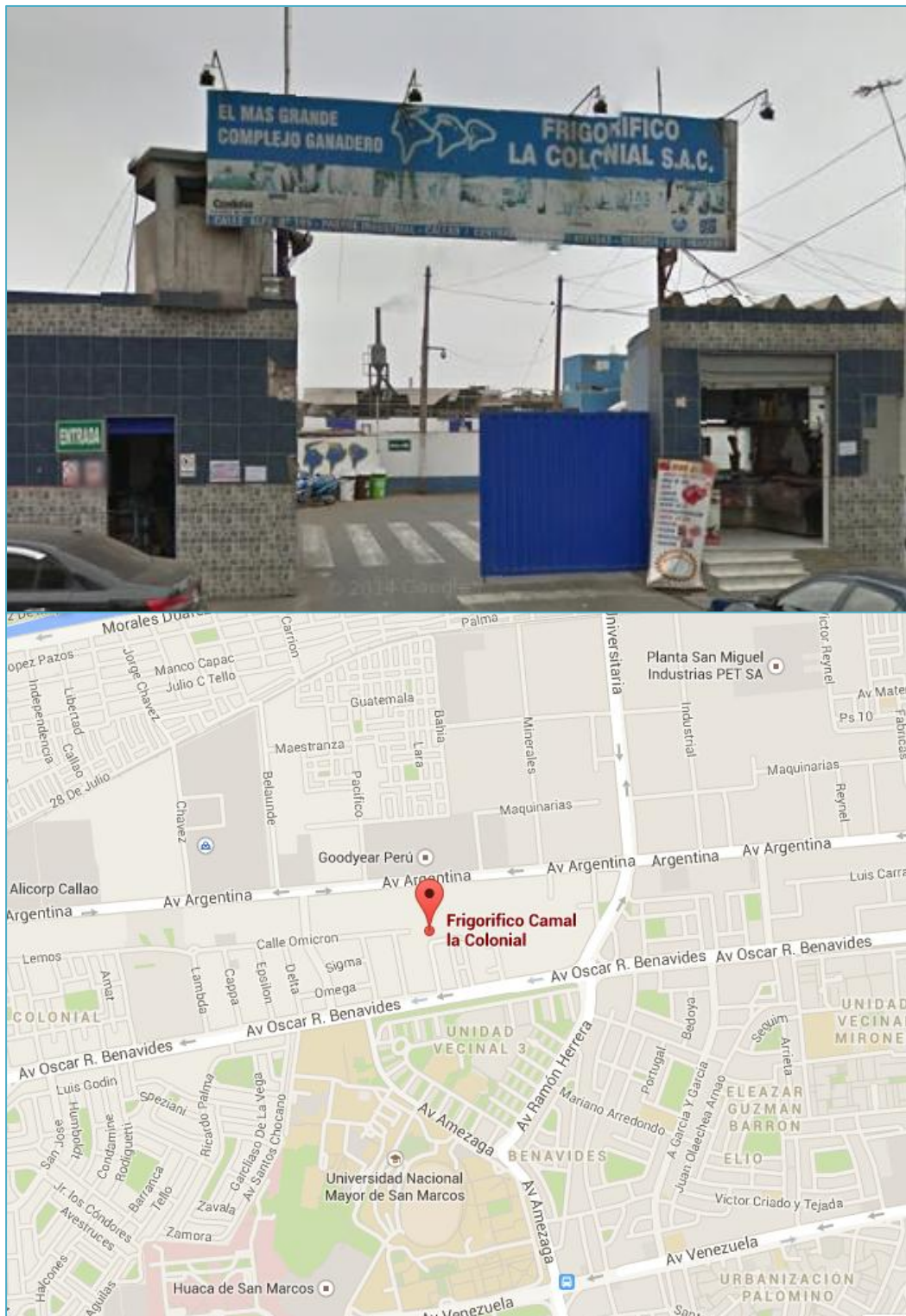
Código CEPA	TIPO DE MUESTRA	GRUPO POBLACIONAL	FECHA DE AISLAMIENTO
1	Sangre	Neonato	10 /02 /2001
2	Sangre	Neonato	10 /07 /2001
3	Sangre	Neonato	31 /08 /2001
4	Líquido Amniótico	Gestante	11 /10 /2001
4'	Sangre	Neonato	12 /10 /2001
5	Líquido Cefalorraquídeo	Neonato	15 /10 /2002
6	Líquido Amniótico	Gestante	14 /01 /2003
7	Sangre	Neonato	13 /01 /2003
8	Sangre	Neonato	10 /02 /2003
9	Sangre	Neonato	09 /10 /2003
10	Sangre	Neonato	19 /01 /2004
11	Sangre	Gestante	23 /04 /2004
12	Secreción Conjuntival	Neonato	22 /07 /2004
12'	Sangre	Neonato	26 /07 /2004
13	Sangre	Neonato	08 /11 /2004
14	Líquido Cefalorraquídeo	Neonato	17 /11 /2004
15	Líquido Cefalorraquídeo	Neonato	18 /11 /2004
16	Sangre	Gestante	22 /03 /2005
17	Líquido Amniótico	Gestante	03 /05 /2005
18	Sangre	Neonato	10 /06 /2005

4 y 4' corresponden a cepas de un mismo caso (una de la gestante y otra de su neonato).

12 y 12' corresponden a cepas de un mismo caso (dos del neonato)

Fuente: Villegas, 2010

Anexo 3. Ubicación del centro frigorífico La Colonial S.A.C.



Anexo 4. Kit de diagnóstico para *L. monocytogenes*



Anexo 5. Valores críticos de la tabla chi cuadrado (Moore, 2005)

	<i>p</i>											
gl	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	0,025	0,02	0,01	0,005	0,0025	0,001	0,0005
1	1,32	1,64	2,07	2,71	3,84	5,02	5,41	6,63	7,88	9,14	10,83	12,12
2	2,77	3,22	3,79	4,61	5,99	7,38	7,82	9,21	10,60	11,98	13,82	15,20
3	4,11	4,64	5,32	6,25	7,81	9,35	9,84	11,34	12,84	14,32	16,27	17,73
4	5,39	5,99	6,74	7,78	9,49	11,14	11,67	13,28	14,86	16,42	18,47	20,00
5	6,63	7,29	8,12	9,24	11,07	12,83	13,39	15,09	16,75	18,39	20,51	22,11
6	7,84	8,56	9,45	10,64	12,59	14,45	15,03	16,81	18,55	20,25	22,46	24,10
7	9,04	9,80	10,75	12,02	14,07	16,01	16,62	18,48	20,28	22,04	24,32	26,02
8	10,22	11,03	12,03	13,36	15,51	17,53	18,17	20,09	21,95	23,77	26,12	27,87
9	11,39	12,24	13,29	14,68	16,92	19,02	19,68	21,67	23,59	25,46	27,88	29,67
10	12,55	13,44	14,53	15,99	18,31	20,48	21,16	23,21	25,19	27,11	29,59	31,42
11	13,70	14,63	15,77	17,28	19,68	21,92	22,62	24,72	26,76	28,73	31,26	33,14
12	14,85	15,81	16,99	18,55	21,03	23,34	24,05	26,22	28,30	30,32	32,91	34,82
13	15,98	16,98	18,20	19,81	22,36	24,74	25,47	27,69	29,82	31,88	34,53	36,48
14	17,12	18,15	19,41	21,06	23,68	26,12	26,87	29,14	31,32	33,43	36,12	38,11
15	18,25	19,31	20,60	22,31	25,00	27,49	28,26	30,58	32,80	34,95	37,70	39,72
16	19,37	20,47	21,79	23,54	26,30	28,85	29,63	32,00	34,27	36,46	39,25	41,31
17	20,49	21,61	22,98	24,77	27,59	30,19	31,00	33,41	35,72	37,95	40,79	42,88
18	21,60	22,76	24,16	25,99	28,87	31,53	32,35	34,81	37,16	39,42	42,31	44,43
19	22,72	23,90	25,33	27,20	30,14	32,85	33,69	36,19	38,58	40,88	43,82	45,97
20	23,83	25,04	26,50	28,41	31,41	34,17	35,02	37,57	40,00	42,34	45,31	47,50
21	24,93	26,17	27,66	29,62	32,67	35,48	36,34	38,93	41,40	43,78	46,80	49,01
22	26,04	27,30	28,82	30,81	33,92	36,78	37,66	40,29	42,80	45,20	48,27	50,51
23	27,14	28,43	29,98	32,01	35,17	38,08	38,97	41,64	44,18	46,62	49,73	52,00
24	28,24	29,55	31,13	33,20	36,42	39,36	40,27	42,98	45,56	48,03	51,18	53,48
25	29,34	30,68	32,28	34,38	37,65	40,65	41,57	44,31	46,93	49,44	52,62	54,95
26	30,43	31,79	33,43	35,56	38,89	41,92	42,86	45,64	48,29	50,83	54,05	56,41
27	31,53	32,91	34,57	36,74	40,11	43,19	44,14	46,96	49,64	52,22	55,48	57,86
28	32,62	34,03	35,71	37,92	41,34	44,46	45,42	48,28	50,99	53,59	56,89	59,30
29	33,71	35,14	36,85	39,09	42,56	45,72	46,69	49,59	52,34	54,97	58,30	60,73
30	34,80	36,25	37,99	40,26	43,77	46,98	47,96	50,89	53,67	56,33	59,70	62,16
40	45,62	47,27	49,24	51,81	55,76	59,34	60,44	63,69	66,77	69,70	73,40	76,09
50	56,33	58,16	60,35	63,17	67,50	71,42	72,61	76,15	79,49	82,66	86,66	89,56
60	66,98	68,97	71,34	74,40	79,08	83,30	84,58	88,38	91,95	95,34	99,61	102,7
80	88,13	90,41	93,11	96,58	101,9	106,6	108,1	112,3	116,3	120,1	124,8	128,3
100	109,1	111,7	114,7	118,5	124,3	129,6	131,1	135,8	140,2	144,3	149,4	153,2

Anexo 6. Presencia de *L. monocytogenes* en canales bovinas (grupo 1)

N° de muestra	Refrigeración				Presencia de <i>L. monocytogenes</i> *	
	Antes		Después		Antes	Después
	Fecha	V. A	Fecha	V. A		
1	23/11	3.742	24/11	1.413	+	+
2	23 / 11	3.106	24/11	1.545	+	+
3	23 / 11	1.54	24/11	1.135	+	+
4	23 / 11	0.866	24/11	3.856	+	+
5	23 / 11	1.047	24/11	1.979	+	+
6	23 / 11	0.23	24/11	0.451	+	+
7	23 / 11	0.196	24/11	0.353	+	+
8	28/11	0.512	29/11	0.455	+	+
9	28/11	0.337	29/11	0.523	+	+
10	28/11	0.031	29/11	0.652	-	+
11	28/11	0.15	29/11	1.404	+	+
12	28/11	0.188	29/11	2.309	+	+
13	28/11	0.886	29/11	0.013	+	-
14	07/12	0.44	08/12	0.005	+	-
15	07/12	0.229	08/12	-0.015	+	-
16	07/12	1.133	08/12	-0.044	+	-
17	12/12	0.057	13/12	0.163	-	+
18	12/12	0.09	13/12	0.018	-	-
19	12/12	0.001	13/12	0.004	-	-
20	12/12	-0.034	13/12	0.006	-	-
21	12/12	-0.062	13/12	0.029	-	-
22	12/12	0.02	13/12	0.031	-	-
23	12/12	-0.02	13/12	0.04	-	-
24	12/12	0.026	13/12	0.028	-	-
25	12/12	0.039	13/12	0.052	-	-
26	12/12	0.062	13/12	0.017	-	-
27	12/12	0.016	13/12	0.009	-	-
28	12/12	-0.001	13/12	0.016	-	-
29	12/12	-0.038	13/12	0.027	-	-

*Determinado por los valores de absorbancia obtenidos en el Lector ELISA según especificación del kit diagnóstico. Positivo (+): Resultados de Elisa ≥ 0.1 , presencia de *L. monocytogenes* y Negativo (-): Resultados de Elisa < 0.1 ausencia de *L. monocytogenes*

VA: valor de absorbancia final evaluadas a las 48 horas de la toma de muestra

Anexo 7. Presencia de *L. monocytogenes* en canales bovinas (Grupo 2)

N° de muestra	Refrigeración y ácido láctico 2.5%				Presencia de <i>L. monocytogenes</i> *	
	Antes		Después		Antes	Después
	Fecha	V. A	Fecha	V. A		
1	23/11	0.608	24/11	3.944	+	+
2	23 / 11	1.098	24/11	0.185	+	+
3	23 / 11	1.02	24/11	0.605	+	+
4	23 / 11	0.232	24/11	0.287	+	+
5	23 / 11	0.25	24/11	0.322	+	+
6	23 / 11	0.182	24/11	0.542	+	+
7	28/11	0.961	29/11	0.096	+	-
8	28/11	1.285	29/11	0.071	+	-
9	28/11	1.238	29/11	0.102	+	+
10	28/11	0.401	29/11	0.097	+	-
11	28/11	2.987	29/11	0.686	+	+
12	07/12	1.198	08/12	-0.025	+	-
13	07/12	0.564	08/12	-0.071	+	-
14	07/12	1.168	08/12	-0.04	+	-
15	07/12	0.425	08/12	-0.058	+	-
16	07/12	0.804	08/12	-0.045	+	-
17	07/12	0.484	08/12	0.095	+	-
18	07/12	0.716	08/12	0.016	+	-
19	07/12	0.973	08/12	0	+	-
20	07/12	1.516	08/12	-0.065	+	-
21	07/12	1.422	08/12	-0.068	+	-
22	07/12	0.617	08/12	0.264	+	+
23	07/12	0.686	08/12	0.02	+	-
24	07/12	0.864	08/12	0.095	+	-
25	07/12	0.81	08/12	0.225	+	+
26	07/12	1.407	08/12	0.721	+	+
27	07/12	1.668	08/12	0.309	+	+
28	07/12	1.671	08/12	-0.019	+	-
29	07/12	0.758	08/12	-0.042	+	-

*Determinado por los valores de absorbancia obtenidos en el Lector ELISA según especificación del kit diagnóstico. Positivo (+): Resultados de Elisa ≥ 0.1 , presencia de *L. monocytogenes* y Negativo (-): Resultados de Elisa < 0.1 ausencia de *L. monocytogenes*

VA: valor de absorbancia final evaluadas a las 48 horas de la toma de muestra

Anexo 8. Criterios microbiológicos para carnes (NTS N° 071, 2008)

10.3 Carne cruda, refrigerada y congelada de bovinos, porcino, ovinos, caprinos, camélidos, otros.						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g.	
					m	M
Aerobios mesófilos (30° C)	2	3	5	2	10 ⁵	10 ⁷
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g

Anexo 9. Criterios microbiológicos para Quesos (NTS N° 071, 2008)

1.9 Quesos no madurados (queso fresco tradicional, mantecoso, ricota, cabaña, petit suisse, mozzarella ucayalino, otros)						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g.	
					m	M
Coliformes	5	3	5	2	5x10 ²	10 ³
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	3	5	2	10	10 ²
<i>Escherichia. coli</i>	6	3	5	1	3	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g

1.10 Quesos madurados (camembert, brie, roquefort, gorgonzola, cuartirolo, cajamarca, tilsit, andino, majes, characato, sabandía, dambo, gouda, edam, paria, emmental, gruyere, cheddar, provolone, amazónico, parmesano, otros).						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g.	
					m	M
<i>Enterobacteriaceas</i>	5	3	5	2	2x10 ²	10 ³
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	3	5	1	10	10 ²
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g

Anexo 10. Criterios microbiológicos para Embutidos (NTS N° 071, 2008)

10.11 Embutidos con tratamiento térmico (curados: jamón inglés, tocino, costillas, chuletas, otros; escaldados: hot dog, salchichas y fiambres: jamonada, jamón del país, mortadela, pastel de jamón, pastel de carne, longaniza, otros; cocidos: queso de chanco, morcilla, relleno, chicharrón de prensa, paté, otros).

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g.	
					m	M
Aerobios mesófilos (30° C)	3	3	5	1	5x10 ⁴	5x10 ⁵
<i>Escherichia. coli</i>	6	3	5	1	10	10 ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	3	5	1	10	10 ²
<i>Clostridium perfringes</i>	6	3	5	1	10	10 ²
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g

Anexo 11. Criterios microbiológicos para Frutas y hortalizas (NTS N° 071, 2008)

14.2 Frutas y hortalizas frescas semiprocadas (lavadas, desinfectadas, peladas, cortadas y/o precocidas) **refrigeradas y/o congeladas.**

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g.	
					m	M
Aerobios mesófilos (30° C)	1	3	5	3	10 ⁴	10 ⁶
<i>Escherichia. coli</i>	5	3	5	3	10	10 ²
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g
<i>L. monocytogenes</i> (*)	10	2	5	0	Ausencia /25 g

(*) Solo para frutas y hortalizas de tierra (a excepción de las precocidas).

Anexo 12. Criterio microbiológico para los alimentos LPC en los que no puede crecer *L. monocytogenes* (CAC/GL 61, 2007)

Punto de aplicación	Microorganismo	n	c	m
Alimentos LPC enviados del procesador final o puerto de entrada (para productos importados) al punto de venta.	<i>Listeria monocytogenes</i>	5 ^a	0	100 UFC/g ^b

Anexo 13. Criterio microbiológico para los alimentos LPC en los que puede crecer *L. monocytogenes* (CAC/GL 61, 2007)

Punto de aplicación	Microorganismo	n	c	m
Alimentos LPC enviados del procesador final o puerto de entrada (para productos importados) al punto de venta.	<i>Listeria monocytogenes</i>	5 ^a	0	Ausencia en 25 g (< 0,04 UFC/g) ^b

Anexo 14. Criterios microbiológicos para carne picada (Reglamento (CE) N° 1441, 2007)

Alimentos	Legislación o Recomendación	Aerobios mesófilos	Enterobacterias Coliformes	E. coli	S. aureus	Salmonella Shigella Mohos Listeria monocytogenes
Carne picada destinada a ser consumida en crudo	Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E. 07/12/2007	n= 5, c= 2 m = 5 x 10 ⁵ M = 5 x 10 ⁶ g.		n= 5, c=2 m = 50 M = 500 g.		Salmonella n=5, c=0, Aus/25 g.
						<i>Listeria monocytogenes</i> n=5, c=0, Aus/25 g
						<i>Listeria monocytogenes</i> n=5, c=0, 100 u.f.c/ g

Dónde:

- n:** Número de unidades de muestra seleccionadas al azar de un lote
- c:** Número máximo de unidades de muestra que puede contener un número de microorganismos comprendidos entre “m” y “M”. Cuando se detecte un número de unidades de muestra mayor a “c” se rechaza el lote.
- m:** Límite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable. En general, un valor igual o menor a “m”, representa un producto aceptable y los valores superiores a “m” indican lotes aceptables o inaceptables.
- M:** Los valores de recuentos microbianos superiores a “M” son inaceptables, el alimento representa un riesgo para la salud.